



Formulation de nanoparticules d'ADN fonctionnalisées par des peptides ligands des chaînes LC8 de la dynéine pour améliorer le trafic intracellulaire dans le transfert de gènes non viral

Coralie Charrat

► To cite this version:

Coralie Charrat. Formulation de nanoparticules d'ADN fonctionnalisées par des peptides ligands des chaînes LC8 de la dynéine pour améliorer le trafic intracellulaire dans le transfert de gènes non viral. Autre. Université Nice Sophia Antipolis, 2016. Français. NNT : 2016NICE4017 . tel-01358416

HAL Id: tel-01358416

<https://theses.hal.science/tel-01358416>

Submitted on 31 Aug 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences
Ecole Doctorale « Sciences Fondamentales et Appliquées »

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences

de l'UNIVERSITE Nice Sophia Antipolis

Discipline : Chimie (section 32)

présentée et soutenue par

Coralie CHARRAT

**FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES
PAR DES PEPTIDES LIGANDS DES CHAINES LC8 DE LA DYNEINE
POUR AMELIORER LE TRAFIC INTRACELLULAIRE
DANS LE TRANSFERT DE GENES NON VIRAL**

Thèse dirigée par *Christophe DI GIORGIO*

soutenue le 22 Avril 2016 devant le jury composé de

Dr Ling PENG	Directeur de Recherche CNRS Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille - UMR 7325 Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Dr Patrick MIDOUX	Directeur de Recherche Centre de Biophysique Moléculaire - UPR 4301 Université d'Orléans	Rapporteur
Dr Rachid BENHIDA	Directeur de Recherche CNRS Institut de Chimie de Nice - UMR 7272 Université Nice Sophia Antipolis	Examineur
Dr Christophe DI GIORGIO	Maître de conférences Institut de Chimie de Nice - UMR 7272 Université Nice Sophia Antipolis	Directeur de thèse

A ma fille, Norah, née le 8 décembre 2013

REMERCIEMENTS

Merci en premier lieu à la directrice de l'Institut de Chimie de Nice (ICN), Elisabeth Duñach, ainsi qu'au directeur de l'équipe « molécules bioactives », Rachid Benhida, pour leur accueil. Je remercie aussi très chaleureusement mon directeur de thèse, Christophe Di Giorgio, pour la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir encadré mon travail avec un œil critique et bienveillant. Je remercie également Lionel Massi, Marc Gayinski, Jean-Marie Guignonis (TIRO, iBEB), Agnès Loubat (iBV) et Olga Volkova (LPMC) pour leur collaboration. Un grand merci à Béatrice Cambien (Laboratoire TIRO, iBEB, Nice) pour m'avoir accueilli dans ses locaux alors que la chance ne me souriait plus tellement en cette fin de thèse.

Je remercie ensuite, tout particulièrement, les membres de mon jury. Merci à Ling PENG et Patrick Midoux d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci à Rachid Benhida d'en être examinateur.

Merci à mes colocataires du 5^{ème} (et 4^{ème}) étage pour leur bonne humeur au quotidien : Nicolas, Janah, Ahn, Johana, Pascal, Estelle, Caterina, Mauro, Lauranne, Alexandra, Hella, Antoine... Merci à Florian d'être arrivé au bon moment pour m'aider à ordonner le labo... mais surtout pour tous ces bons moments partagés. Merci aux anciens Jean-Patrick, Bruno et Camille, qui ont beaucoup compté pendant ces années et avec qui j'ai tant de bons souvenirs. Merci aux plus expérimentés, Pierre, Maria, Stéphane, Audrey, Alain, Benoît, Mohamed, Anthony, Cyril, Luc et Nadine pour leurs précieux conseils. Merci aussi aux gestionnaires Christelle et Patricia pour leur aide.

Je remercie également ma famille et mes amis les plus proches, qui m'accompagnent bien au-delà de cette expérience. Merci à mes parents et mes beaux-parents pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans de telles conditions. Merci à ma sœur, Laurie, et mon frère, Dylan, sur qui je peux compter depuis toujours et pour toujours. Un merci tout particulier à Nadia pour son rôle si singulier et son soutien quotidien. Tu vas beaucoup me manquer... Merci aussi à vous autres que j'aime tant : Sébastien, Inès, Nicole, Robert, Claudette, Loulou, Sarah, Brice, Aaron et Esther.

Enfin, je remercie l'homme qui partage ma vie, Orens, pour son soutien indéfectible et son amour infini. Je mesure chaque jour la chance de t'avoir à mes côtés. Je ne pourrais terminer sans embrasser ma fille, Norah, née pendant cette thèse et que j'aime inconditionnellement.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAA : Activité cellulaire variée ATPase Associée

AAV : *Adeno-Associated Virus* (virus adéno-associé)

Ac : Acétyle

ADA-SCID : *Adenosine deaminase severe combined immunodeficiency* (déficit immunitaire combiné sévère par déficience en adénosine désaminase)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AN : Acide Nucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : Interférence à acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASGP-R : *Asialoglycoprotein Receptor* (récepteur aux asialoglycoprotéines)

ATP : Adénosine triphosphate

B

BCA : Acide bicinchonique

Boc : *ter*-Butyloxycarbonyl

BET : Bromure d'éthidium

br s : *Broad singlet* (singulet large)

C

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDs : Cyclodextrines

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique)

CMC : Concentration Micellaire Critique

CMV : Cytomégalovirus

CPPs : *Cell Penetrating Peptides* (peptides pénétrants)

CREB : *C-AMP Response Element-binding protein* (protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique)

CTAB : Bromure de cetyltriméthylammonium

CuAAC : Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen catalysée par le cuivre(I)

D

d : Doublet

DCC : *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide

DC-Chol : 3 β -[*N*-(*N,N'*-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol

dd : Doublet dédoublé

ddd : Doublet dédoublé dédoublé

DIC : *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide
DIPEA : *N,N'*-diisopropyléthylamine
DLC-AS : *Dynein Light Chain Association Sequence* (séquence d'interaction avec les chaînes légères de la dynéine)
DLS : *Dynamic Light Scattering* (diffusion quasi-élastique de la lumière)
DMAP : 4-(Diméthylamino)pyridine
DMEM : *Dulbecco's Medium Eagle Modified* (milieu de Eagle modifié par Dulbecco)
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : *N,N*-diméthylsulfoxyde
Dmt : Diméthylthiazol
DOGS : Dioctadécylamidoglycyl spermine
DOGSDSO : 1,2-Dioléoyl-sn-glycéro-3-succinyl-2-hydroxyéthyl disulfure ornithine
DOPC : 1,2-Dioléoyl-sn-3-glycéro-3-phosphocholine
DOPE : Dioléoyl-phosphatidyléthanolamine
DORIE : Bromure de 1,2-dioleoyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthyl ammonium
DOSPA : 2,3-Dioléoxy-*N*-[2-(spermine-carboxamido)éthyl]-*N,N*-diméthyl-1-propanammonium trifluoroacétate
DOTAP : *N*-[1-(2, 3-Dioléoxyloxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium méthylsulfate
DOTMA : Chlorure de *N*-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium)
DPH : 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
DTS : *DNA Nuclear Targeting Sequence*
DTT : Dithiothréitol

E

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
Egl : Egalitarian
ENCODE : *Encyclopedia of DNA Elements* (encyclopédie des éléments de l'ADN)
EPR : *Enhanced Permeability and Retention effect* (effet de perméabilité et de rétention accrue)
ESI : Electrospray Ionisation (ionisation par électrospray)
Et : Ethyle

F

FB : Formule Brute
Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyl
FSC : *Foward-Scattered Channel* (diffusion frontale de la lumière)
FSs : Fluosphères (en polystyrène)
FTMS : *Fourier Transform Mass Spectrometry* (spectrométrie de masse à transformée de Fourier)

G

GSH : Glutathion réduit
GTP : Guanosine triphosphate

H

HBTU : *N,N,N',N'*-Tétraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate

HC : *Heavy Chains* (chaînes lourdes)

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique

HOBt : *N*-Hydroxybenzotriazole

HOSu : *N*-Hydroxysuccinimide

HRMS : *High-Resolution Mass Spectrometry* (spectrométrie de masse haute résolution)

HSPGs : *Heparan Sulfate Proteoglycan's* (protéoglycanes de type sulfate d'héparine)

HSV1-TK : *Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase* (thymidine kinase du virus Herpes simplex de type 1)

I

IC : *Intermediaite Chains* (chaînes intermédiaires)

ID : Indice de Dissociation

(IEP)-CMV : *Cytomegalovirus Immediate-Early Promoter* (promoteur du gène précoce du cytomégalovirus)

IRF : Intensité Relative de Fluorescence

L

LA : Acide lipoïque

LC : *Light Chains* (chaînes légères ex. LC8)

LIC : *Light Intermediate Chains* (chaînes légères intermédiaires)

M

m : Multiplet

M3-PALS : *Mixed Mode Measurement Phase Analysis Light Scattering* (Analyse de la diffusion quasi-élastique par un mode de mesure mixte de la phase)

Me : Méthyle

MET : Microscopie Electronique à Transmission

miARN : Micro acide ribonucléique

MLV : *Murine Leukemia Virus* (virus de la leucémie murine)

MS : *Mass Spectrometry* (spectrométrie de masse)

MTOC : Microtubule-Organizing Center (centre organisateur des microtubules)

MTs : Microtubules

MWCO : *Molecular Weight Cut-Off* (seuil de retention moléculaire)

N

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NES : *Nuclear Export Signal* (séquence d'export nucléaire)

NLS : *Nuclear Localization Signal* (séquence de localisation nucléaire)

NPCs : *Nuclear Pore Complexes* (complexes du pore nucléaire)

NPs : Nanoparticules
NTB : 2-nitro-5-thiobenzoate

O

OTC : *Ornithine transcarbamylase deficiency* (déficit en ornithine transcarbamylase)

P

pb : Paires de bases
Pbf : 2,2,4,6,7-Pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyle
PBS : *Phosphate Buffered Saline* (tampon phosphate salin)
Pdl : Indice de Polydispersité
PEG : Polyéthylène glycol
PEI : Polyéthylène imine
PEIb : Polyéthylène imine branché
PLL : Poly-L-lysine
PM : Poids Moléculaire
Ppm : Parties par million
PTDs : *Protein Transduction Domains* (domaines de transduction des protéines)

Q

q : Quadruplet
quint : Quintuplet

R

RC : Cellulose régénérée
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RPP : *Rabies virus Phosphoprotein P* (phosphoprotéine P du virus de la rage)

S

s : Singulet
SDS : Dodécylsulfate de sodium
sext : Sextuplet
shARN : *Short hairpin ribonucleic acid* (petit ARN en épingle à cheveux)
siARN : *Small Interfering ribonucleic acid* (petit ARN interférant)
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SSC : *Side-Scattered Channel* (diffusion latérale de la lumière)
SVF : Sérum de Veau Foetal
SV40 : *Simian Virus 40* (virus simien 40)

T

t : Triplet

TAE : Tris-Acétate-EDTA

Tat : *Trans-activator of transcription* (transactivateur de transcription)

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

td : Triplet dédoublé

TEG : Triéthylène glycol

TFA : Acide trifluoroacétique

TFE : Trifluoroéthanol

THF : Tétrahydrofurane

TIS : Triisopropylsilane

Trt : Trityle

U

US : Ultrasons

UV : Ultraviolet

V

VHS-1 : Virus Herpes Simplex de type 1

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIP : *Vectored Immunoprophylaxis* (immunoprophylaxie vectorisée)

X

X-ALD : *X-Linked adrenoleukodystrophy* (adrénoleucodystrophie liée à l'X)

X-SCID : *X-Linked severe combined immunodeficiency* (déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X)

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	- 7 -
INTRODUCTION GENERALE	- 19 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 27 -
PARTIE I : LA THERAPIE GENIQUE ET LES VECTEURS DE TRANSFERT DE GENES	- 29 -
I. Introduction à la thérapie génique : le gène comme médicament	- 31 -
I.1 Maladies génétiques	- 31 -
I.2 Thérapie génique et « gène médicament »	- 32 -
I.3 Bref historique des essais cliniques	- 34 -
II. Stratégies de thérapie génique	- 35 -
II.1 Différents modes d'administration	- 35 -
II.2 Différentes stratégies de transfert de gènes	- 36 -
II.2.1 Maladies monogéniques héréditaires	- 36 -
II.2.2 Cancers	- 37 -
II.2.3 Maladies infectieuses	- 38 -
II.3 Thérapie génique ou délivrance d'acides nucléiques	- 38 -
III. Outils du transfert de gènes	- 40 -
III.1 Thérapie génique virale	- 40 -
III.1.1 Virus intégratifs	- 41 -
III.1.2 Virus non intégratifs	- 42 -
III.1.3 Bilan sur les vecteurs viraux	- 43 -
III.2 Thérapie génique non virale	- 44 -
III.2.1 Méthodes physiques	- 44 -
III.2.2 Méthodes chimiques : vecteurs synthétiques	- 46 -
III.2.2.1 Systèmes lipidiques (poly)cationiques et lipoplexes	- 46 -
III.2.2.2 Systèmes polymériques polycationiques et polyplexes	- 51 -
III.2.2.3 Systèmes basés sur l'amphiphilie faciale : exemple des cyclodextrines	- 53 -
III.2.2.4 Bilan sur les vecteurs synthétiques	- 55 -
IV. Barrières au transfert de gènes par les vecteurs non viraux	- 56 -
IV.1 Barrières extracellulaires : circulation dans les fluides biologiques	- 57 -
IV.2 Entrée dans la cellule	- 58 -
IV.3 Trafic intracellulaire	- 60 -
IV.3.1 Sortie des endosomes	- 60 -
IV.3.1.1 Mécanisme d' « éponge à protons » : cas des polyplexes	- 61 -
IV.3.1.2 Mécanisme « flip-flop » et déstabilisation de la membrane endosomale	- 62 -
IV.3.2 Routage intracellulaire jusqu'au noyau	- 64 -
IV.3.2.1 Decomplexation	- 64 -
IV.3.2.2 Transport cytosolique	- 65 -

IV.3.3 Transport nucléaire	- 65 -
IV.3.4 Expression du transgène	- 67 -
V. Conclusion : vers la formulation de virus synthétiques	- 68 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 70 -
 PARTIE II : ELABORATION DE VIRUS SYNTHETIQUES POUR L'AMELIORATION DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DU GENE	 - 83 -
CHAPITRE I : INTRODUCTION	- 85 -
I. Cytosquelette et trafic intracellulaire	- 85 -
I.1 Cytosquelette	- 85 -
I.1.1 Filaments d'actine	- 86 -
I.1.2 Filaments intermédiaires	- 86 -
I.1.3 Microtubules	- 86 -
I.2 Réseau de transport intracellulaire	- 87 -
I.2.1 Moteurs moléculaires	- 88 -
I.2.1.1 Associés à l'actine : myosines	- 88 -
I.2.1.2 Associés aux microtubules : kinésines et dynéines	- 88 -
II. Utilisation du cytosquelette par les virus	- 92 -
III. Utilisation du cytosquelette par des nanoparticules ou des vecteurs synthétiques fonctionnalisés	- 93 -
III.1 Utilisation de fluosphères fonctionnalisées	- 93 -
III.2 Utilisation de vecteurs non viraux fonctionnalisés	- 94 -
IV. Objectif général du projet	- 96 -
IV.1 Système basé sur des dérivés du 1,2-dithiolane	- 98 -
IV.2 Système basé sur des dérivés cystéine	- 99 -
IV.3 Système basé sur des dérivés octaarginine	-100-
 CHAPITRE II : FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES BASEES SUR DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE	 -103-
I. Design des molécules à base de 1,2-dithiolane et des contrôles	-104-
II. Synthèse des amphiphiles cationiques et des conjugués pegylés	-105-
III. Formulation et caractérisation physico-chimique des complexes d'ADN issus des dérivés du 1,2-dithiolane	-108-
III.1 Plasmide utilisé	-108-
III.2 Méthodes générales de caractérisation des complexes d'ADN	-109-
III.3 Formulation des complexes d'ADN à base de 1,2-dithiolane	-109-
III.4 Condensation de l'ADN en nanoparticules quasi-monomoléculaires	-110-
III.4.1 Evaluation de l'état de compaction de l'ADN	-110-
III.4.2 Etude du processus de polymérisation du motif 1,2-dithiolane	-111-
III.4.2.1 Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium	-111-

III.4.2.2 Suivi UV du chromophore 1,2-dithiolane	-112-
III.5 Fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'ADN	-113-
III.5.1 Evaluation de l'intégrité des nanoparticules après fonctionnalisation	-113-
III.5.2 Mesure de la taille et du potentiel zêta	-114-
III.5.3 Morphologie des complexes	-116-
III.5.4 Effet de sel	-116-
III.6 Conclusion sur l'étude physico-chimique des complexes d'ADN issus des dérivés du 1,2-dithiolane	-117-
IV. Etude du comportement <i>in vitro</i> des nanoparticules d'ADN à base de 1,2-dithiolane	-118-
IV.1 Transfection <i>in vitro</i> des complexes	-118-
IV.2 Internalisation cellulaire des complexes	-119-
IV.3 Conclusion sur l'étude du comportement <i>in vitro</i> des nanoparticules d'ADN à base de 1,2-dithiolane	-120-
V. Conclusion sur le système basé sur des dérivés du 1,2-dithiolane	-120-
CHAPITRE III : FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES PAR DES DERIVES CYSTEINE	-122-
I. Design des molécules à base de cystéine et des contrôles	-123-
II. Synthèse de l'amphiphile cationique et des conjugués pegylés	-124-
II.1 Synthèse de l'amphiphile monocationique et perfluoroalkylé dimérisable	-124-
II.2 Synthèse des conjugués pegylés perfluoroalkylés oligomérisables	-125-
II.2.1 Première approche	-125-
II.2.1.1 Synthèse des précurseurs de Click	-126-
II.2.1.2 Mono- et double-Click	-126-
II.2.2 Seconde approche	-128-
II.2.3 Conclusion sur la synthèse des amphiphiles cystéine	-130-
III. Cac de l'amphiphile monocationique et perfluoroalkylé dimérisable	-130-
IV. Stabilité des amphiphiles en milieu HCl (test DPH)	-132-
V. Formulation des complexes d'ADN à base de dérivés cystéine	-132-
VI. Caractérisation physico-chimique des complexes d'ADN à base de dérivés cystéine	-133-
VI.1 Condensation de l'ADN par l'amphiphile monocationique et perfluoroalkylé dimérisable	-133-
VI.1.1 Evaluation du retard sur gel par électrophorèse	-133-
VI.1.2 Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium	-134-
VI.1.3 Mesure de taille et de potentiel zêta	-134-
VI.2 Fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'ADN	-136-
VI.2.1 Evaluation de l'intégrité des nanoparticules après fonctionnalisation	-136-
VI.2.2 Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium	-136-
VI.2.3 Mesure de taille et de potentiel zêta	-137-
VI.2.4 Morphologie des complexes	-139-

VI.3 Conclusion sur l'étude physico-chimique des complexes d'ADN à base de dérivés cystéine	-139-
VII. Etude du comportement <i>in vitro</i> des nanoparticules d'ADN à base de résidus cystéine	-140-
VII.1 Transfection <i>in vitro</i> des complexes décorés	-140-
VII.2 Transfection <i>in vitro</i> des complexes en présence d'un inhibiteur de microtubules	-142-
VII.3 Conclusion sur l'étude du comportement <i>in vitro</i> des nanoparticules d'ADN à base de résidus cystéine	-143-
VIII. Conclusion sur le système à base de résidus cystéine	-144-
 CHAPITRE IV : FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES BASEES SUR DES DERIVES OCTAARGININE	 -146-
I. Design des molécules a base d'octaarginine et des contrôles	-146-
II. Synthèse de l'amphiphile polycationique et des conjugués pegylés	-147-
III. Cac de l'amphiphile polycationique octaarginine perfluoroalkylé	-150-
IV. Formulation des complexes d'ADN a base de dérivés octaarginine	-150-
V. Caractérisation physico-chimique des complexes d'ADN à base de dérivés octaarginine	-151-
V.1 Condensation de l'ADN en conditions monomoléculaires	-151-
V.1.1 Evaluation de l'état de compaction de l'ADN	-151-
V.1.2 Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium	-151-
V.1.3 Mesure de taille et de potentiel zêta	-152-
V.2 Fonctionnalisation de surface des nanoparticules d'ADN	-154-
V.2.1 Evaluation de l'intégrité des nanoparticules après fonctionnalisation	-154-
V.2.2 Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium	-154-
V.2.3 Mesure de taille et de potentiel zêta	-156-
V.2.4 Morphologie des complexes	-156-
V.3 Conclusion sur l'étude physico-chimique des complexes d'ADN à base de dérivés octaarginine	-157-
VI. Etude du comportement <i>in vitro</i> des nanoparticules d'ADN à base de dérivés octaarginine	-158-
VI.1 Transfection <i>in vitro</i> des complexes	-158-
VI.2 Conclusion sur l'étude du comportement <i>in vitro</i> des nanoparticules d'ADN à base de dérivés octaarginine	-159-
VII. Fonctionnalisation de polyplexes de PEI par des séquences dimériques DLC8-AS	-160-
VII.1 Formulation des polyplexes de PEI décorés par les conjugués pegylés octaarginine et perfluoroalkylés	-161-
VII.2 Caractérisation physique des polyplexes de PEI décorés	-161-
VII.3 Etude du comportement <i>in vitro</i> des polyplexes de PEI décorés	-163-
VIII. Conclusion sur les systèmes à base de dérivés octaarginine	-165-
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	-166-

PARTIE III : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	-173-
I. Synthèses	-175-
I.1 Mode opératoire général et instruments	-175-
I.2 Procédures générales de synthèse	-176-
I.2.1 Synthèse peptidique en phase solide – Protocole 1	-176-
I.2.2 Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen catalysée par le cuivre(I) (CuAAC) – Protocol 2	-178-
I.3 Préparation des dérivés du 1,2-dithiolane	-178-
I.3.1 Synthèse des amphiphiles cationiques et des conjugués pegylés neutres	-178-
I.3.2 Synthèse des conjugués pegylés polyanioniques	-183-
I.4 Préparation des dérivés mono- et bis-cystéine	-188-
I.4.1 Synthèse de l'amphiphile cationique	-188-
I.4.2 Synthèse des conjugués pegylés mono- et bis-cystéine	-189-
I.4.2.1 Préparation des synthons pegylés azotures	-189-
I.4.2.2 Préparation des synthons alcynes	-190-
I.4.2.3 Mono- et double-Click	-195-
I.5 Préparation des dérivés octaarginine	-199-
I.5.1 Synthèse de l'amphiphile cationique F_4C_{10} -Arg ₈ -CH ₂ CCH 36	-199-
I.5.2 Synthèse des conjugués pegylés	-200-
II. Détermination de la cac des détergents	-205-
III. Etude de la stabilité des dérivés cystéine en milieu HCl – Test quantitatif d'Ellman	-205-
IV. Préparation des complexes d'ADN	-206-
V. Etudes physico-chimiques	-207-
V.1 Evaluation de l'état de compaction de l'ADN – Electrophorèse sur gel d'agarose	-207-
V.2 Exclusion du bromure d'éthidium	-207-
V.3 Dissociation des complexes en solution saline	-207-
V.4 Etude du cycle 1,2-dithiolane – Spectrométrie UV-visible	-208-
V.5 Taille et potentiel zêta des complexes – Diffusion quasi-élastique de la lumière (DLS) et diffusion de la lumière par analyse de phase et mesure en mode mixte (M3-PALS)	-208-
V.6 Taille et morphologie des complexes – Microscopie électronique à transmission	-208-
VI. Etudes sur cellules <i>in vitro</i>	-208-
VI.1 Culture cellulaire	-208-
VI.2 Transfection <i>in vitro</i> – Mesure de la luciférase	-209-
VI.3 Internalisation cellulaire – Cytométrie de flux	-210-
CONCLUSION GENERALE	-213-

ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE

La thérapie génique est une technique directement issue des avancées majeures en génétique et en biologie moléculaire réalisées durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle. Depuis le séquençage complet du génome humain, achevé en 2003, les progrès de la thérapie génique sont dépendants de l'accumulation de données sur les maladies candidates avec notamment l'identification des gènes impliqués. La dénomination thérapie génique recouvre plus un principe général qu'une technique précise. Il s'agit de transférer une construction d'acides nucléiques (AN) dans des cellules cibles pour leur faire exprimer un gène dit thérapeutique, et compenser un dysfonctionnement ou ajouter une nouvelle fonction cellulaire. Alors que les stratégies classiques ciblent l'activité de protéines (et donc bien souvent les conséquences symptomatiques), la thérapie génique intervient plus en amont (sur les causes), directement sur le génome. Les champs d'application potentiels sont ainsi plus vastes et concernent à la fois les maladies monogéniques héréditaires (mucoviscidose, adrénoleucodystrophie...) et les maladies acquises (cancers, infections virales...).

La thérapie génique a été appliquée pour la première fois à l'Homme en 1989 sous la forme d'un premier essai clinique initié par le professeur Rosenberg, pour traiter des patients atteints d'un mélanome avancé.¹ A ce jour, les quelques 2000 protocoles cliniques recensés² ont contribué à l'identification des étapes limitantes du transfert de gènes. Même si la validité du concept est établie, en témoigne Glybera, première thérapie génique approuvée en Europe pour prévenir des attaques pancréatiques graves,³ les résultats restent bien en deçà des espoirs initiaux.

Le succès de la thérapie génique repose sur l'élaboration de vecteurs de transfert de gènes efficaces et sûrs. En effet, la nature macromoléculaire et polyanionique des acides nucléiques ne les prédispose pas à diffuser spontanément au travers des membranes cellulaires. Ils présentent aussi une grande sensibilité face à l'hydrolyse enzymatique. Ces caractéristiques les rendent dépendants de vecteurs dont le rôle est de les protéger des agressions en milieu biologique, et de les acheminer efficacement depuis leur site d'administration jusqu'au site d'action. Les vecteurs d'origine virale sont encore aujourd'hui les plus utilisés dans les essais cliniques, en raison de la capacité naturelle des virus à infecter leur hôte. Ils renferment alors un génome viral modifié, ou recombinant, porteur du gène thérapeutique. Malgré leur grande efficacité, ces vecteurs présentent de nombreux inconvénients (immunogénicité, taille de l'insert limitée, difficulté et coût de production...) et leur inclusion dans des protocoles cliniques n'est pas sans risque. Ainsi, parallèlement à la mise au point de nouveaux vecteurs viraux, la communauté scientifique s'est tournée vers le développement de systèmes non viraux de transfert de gènes plus sûrs mais bien moins efficaces.

A ce jour, une multitude de vecteurs synthétiques pour la plupart dérivés de lipides ou de polymères (poly)cationiques ont été synthétisés et évalués *in vitro* et *in vivo*. Ces systèmes complexent les acides nucléiques principalement par le biais d'interactions électrostatiques entre leurs charges cationiques et les groupements phosphate anioniques des AN. Les particules résultantes, appelées lipoplexes ou polyplexes, ont montré une excellente capacité à transfecter des

cellules *in vitro*, tout en étant moins toxiques, plus faciles à produire, et plus faciles à manipuler que les vecteurs viraux. Cependant, ces systèmes présentent de sérieuses limitations qui affectent leur efficacité, principalement lorsqu'une application *in vivo* est envisagée. Ceci est imputable (i) à leur nature (poly)cationique à l'origine de nombreuses interactions non spécifiques avec les constituants biologiques et à leur rapide élimination de la circulation sanguine, et (ii) à leur difficulté à franchir les différents obstacles rencontrés pour délivrer leur matériel génétique dans le cytoplasme (cas d'un ARN) ou le noyau cellulaire (cas d'un ADN).

Le succès d'une thérapie génique non virale nécessite donc l'élaboration de systèmes plus performants, capables de contourner les différents obstacles rencontrés en milieu intra- et extracellulaire. Les recherches se sont ainsi concentrées sur le développement de systèmes multifonctionnels appelés « virus synthétiques ou artificiels » (schématisés dans la **Figure 1**).⁴ Ce sont des systèmes multicomposants imaginés en s'inspirant des virus naturels, qui présentent idéalement : (i) une taille nanométrique, (ii) un tropisme et une spécificité cellulaire, (iii) une capacité à contourner le système immunitaire (furtivité), (iv) une délivrance cytoplasmique, (v) un tropisme et une délivrance nucléaire (cas de l'ADN). Ces édifices sont dotés entre autres (i) de polyéthylène glycol (PEG) en surface pour favoriser leur furtivité, (ii) de ligands de ciblage pour induire une reconnaissance cellulaire spécifique, (iii) de peptides fusogènes pour favoriser leur délivrance cytoplasmique, (iv) de peptides de localisation nucléaire pour leur import dans le noyau.

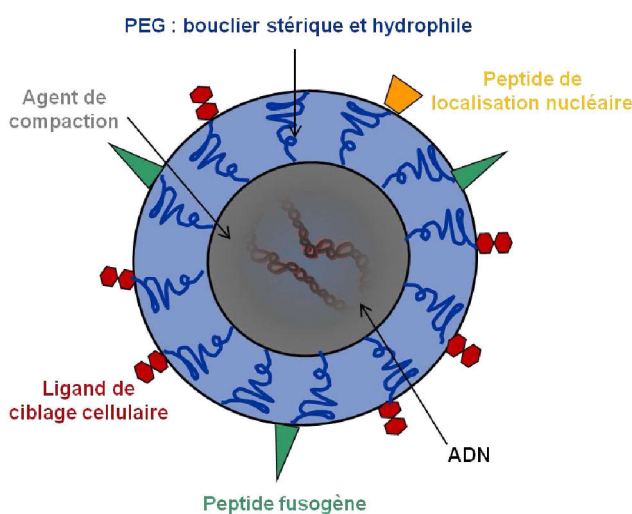


Figure 1 : Représentation schématique d'un virus synthétique

Le projet de thèse qui m'a été confié s'inscrit dans cette optique de formulation de « virus synthétiques ». Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'amélioration du trafic intracellulaire du gène vers le noyau, étape limitante à l'utilisation des vecteurs non viraux qui reste relativement peu étudiée. D'une façon générale, nous avons souhaité obtenir, de façon simple et reproductible, des nanoparticules (NPs) d'ADN :

- dont la taille est la plus petite possible pour avoisiner celle d'une particule virale (< 250 nm) et faciliter leur diffusion dans les fluides biologiques (ex. cytosol),

- dont la surface est fonctionnalisée par des ligands spécifiques pour améliorer le trafic intracellulaire du gène vers le noyau.

La **première partie** de ce manuscrit est dédiée à une revue bibliographique non exhaustive sur la thérapie génique. Nous y décrivons les principaux acteurs du transfert de gènes en insistant sur les vecteurs synthétiques, thématique largement abordée au laboratoire. Nous présentons également les différentes barrières rencontrées par ces systèmes pour permettre une expression efficace du transgène, ainsi que les solutions envisagées jusqu'ici pour tenter de les rendre compétitifs face aux vecteurs viraux.

La **deuxième partie** de ce mémoire est divisée en quatre chapitres. Le **chapitre I** est consacré à la description des acteurs du trafic intracellulaire, ainsi qu'à la présentation des objectifs de la thèse. La stratégie générale repose sur la fonctionnalisation de complexes d'ADN par des ligands de la dynéine cytoplasmique de type I, moteur moléculaire assurant le transport rétrograde (de la périphérie de la cellule jusqu'au noyau) de cargos le long des microtubules. Nous avons choisi d'utiliser des séquences peptidiques spécifiques ciblant les chaînes légères LC8 de la dynéine (DLC8-AS pour *Dynein Light Chain 8 Associated Sequence*). Des travaux préliminaires au laboratoire ont montré que cette stratégie, appliquée à un modèle simplifié basé sur des nanobilles en polystyrène fonctionnalisées, permettait d'augmenter leur concentration périnucléaire.⁵ Toutefois, ces résultats requièrent de hauts taux de fonctionnalisation, difficiles à obtenir dans le cas de complexes d'ADN car pouvant affecter leur stabilité colloïdale. Pour contourner ce problème et pouvoir se contenter de plus faibles degrés de fonctionnalisation, nous avons décidé de favoriser l'affinité de nos ligands pour la cible en utilisant des peptides DLC8-AS sous leur forme dimérique, qui présentent des constantes d'association bien plus élevées que leur forme monomérique.⁶ La stratégie est représentée schématiquement dans la **Figure 2**.

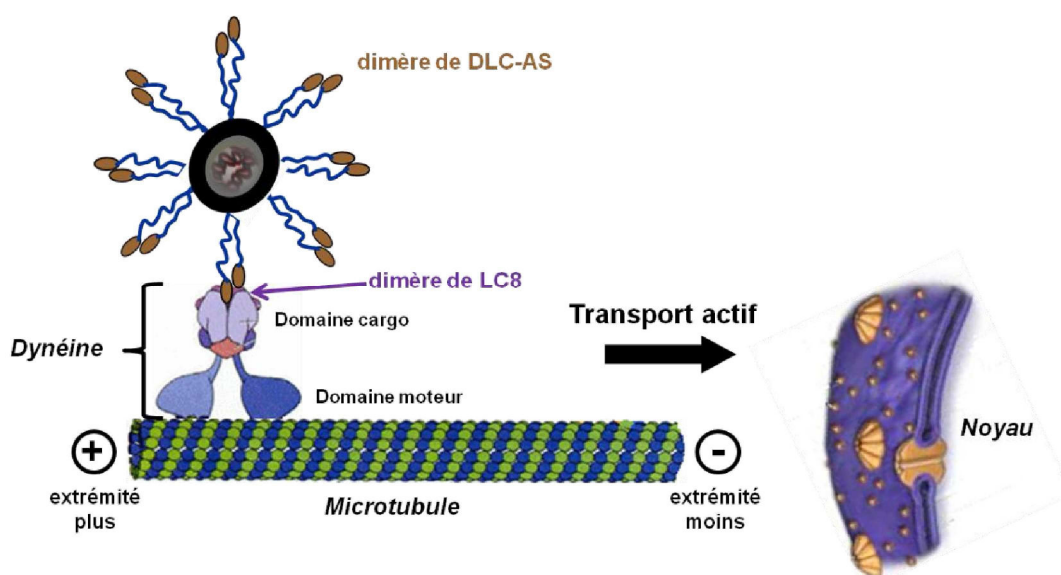


Figure 2 : Transport rétrograde actif *via* la dynéine de complexes d'ADN portant des dimères de DLC-AS

Ainsi, les **chapitres II, III et IV** sont consacrés à la formulation, la caractérisation et l'évaluation sur cellules *in vitro* des systèmes nanoparticulaires développés dans le cadre de cette étude :

- **SYSTEME BASE SUR DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE (CHAPITRE II)**

Pour répondre à la problématique fixée, nous avons envisagé l'utilisation d'un système basé sur des dérivés de l'acide lipoïque, c'est-à-dire contenant un motif 1,2-dithiolane polymérisable. Il s'agit de formuler des NPs fonctionnalisées par des séquences DLC8-AS dimériques, suivant un processus en deux étapes combinant interactions électrostatiques et oligomérisation du motif lipoyl (**Figure 3**) :

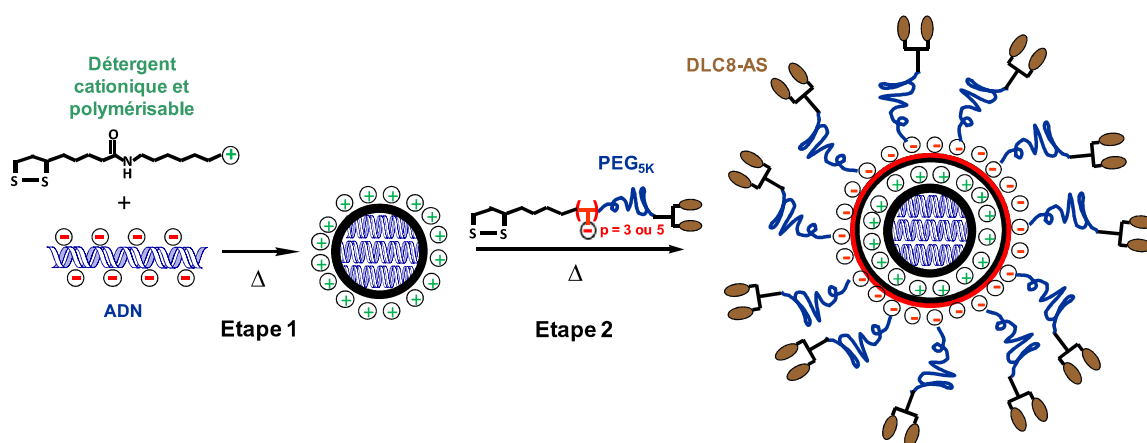


Figure 3 : Fonctionnalisation de NPs d'ADN basées sur des dérivés du 1,2-dithiolane par des dimères de DLC8-AS

- **Étape 1** : L'ADN est condensé par un amphiphile cationique et polymérisable pour conduire à une population monodisperse de NPs cationiques de petites tailles.
- **Étape 2** : La surface des NPs est décorée avec un conjugué pégylé polyanionique et polymérisable contenant le même motif 1,2-dithiolane et des résidus aspartate.

Le choix du motif 1,2-dithiolane devrait permettre (i) de condenser l'ADN en NPs stables en limitant la réversibilité du système *via* l'oligomérisation des amphiphiles cationiques, (ii) d'accéder à un haut taux de fonctionnalisation de surface grâce à un effet synergique entre oligomérisation des motifs lipoyl et interactions électrostatiques des résidus aspartate anioniques avec les NPs cationiques, et (iii) de délivrer l'ADN sous contrôle rédox grâce aux systèmes réducteurs intracellulaires.

- **SYSTEME BASE SUR DES DERIVES CYSTEINE (CHAPITRE III)**

Lors de travaux précédents, l'équipe a développé des amphiphiles cationiques et perfluoroalkylés dimérisables basés sur la cystéine pour condenser l'ADN en une population monodisperse de NPs de petites tailles. Elle a également fonctionnalisé les NPs résultantes avec une ancre hydrophobe pégylée et perfluoroalkylée portant un ligand DLC8-AS. Cette stratégie n'a cependant pas permis une accumulation périnucléaire des NPs décorées après injection intracytoplasmique dans des oocytes de

drosophiles, probablement à cause d'un trop faible taux de fonctionnalisation (résultats non publiés). L'approche envisagée dans le cadre de cette thèse consiste à améliorer ce système par l'adjonction d'une force motrice supplémentaire pour tenter d'augmenter le taux de ligands DLC8-AS en surface des NPs. Le protocole de formulation est donné ci-après (**Figure 4**).

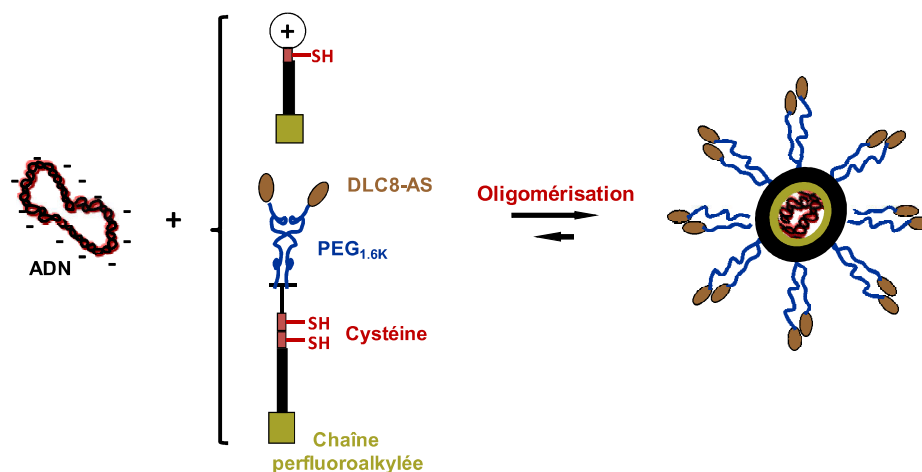


Figure 4 : Fonctionnalisation de NPs d'ADN basées sur des résidus cystéine par des dimères de DLC8-AS

Il s'agit de co-formuler avec l'ADN :

- un amphiphile monocationique, perfluoroalkylé et dimérisable basé sur un résidu cystéine,
- un amphiphile perfluoroalkylé, basé sur deux résidus cystéine et conjugué à un dimère de type PEG_{1,6K}-DLC8-AS à son extrémité.

Outre l'effet bivalent lié à l'utilisation d'un dimère de séquences DLC8-AS pour augmenter l'affinité pour la dynéine, le conjugué pegylé comporte ici un résidu bis-cystéine qui devrait contribuer à améliorer le taux de fonctionnalisation des NPs *via* l'oligomérisation des thiols avec l'agent de compaction.

• **SYSTEME BASE SUR DES DERIVES OCTAARGININE (CHAPITRE IV)**

La dernière approche consiste à utiliser un système purement peptidique basé sur des amphiphiles perfluoroalkylés de type polyarginine. Il s'agit de tirer profit des différents avantages liés à l'utilisation de peptides cationiques en transfert de gènes, qui concernent plus particulièrement (i) leur biocompatibilité et leur biodégradabilité, (ii) leur facilité d'accès, (iii) leur capacité à condenser efficacement l'ADN, et (iv) leur capacité d'internalisation cellulaire. Par ailleurs, l'attachement d'une entité hydrophobe sur la chaîne homopeptidique est susceptible d'induire une amélioration de l'efficacité de transfection des formulations.⁷ Le protocole de formulation est présenté ci-après (**Figure 5**) :

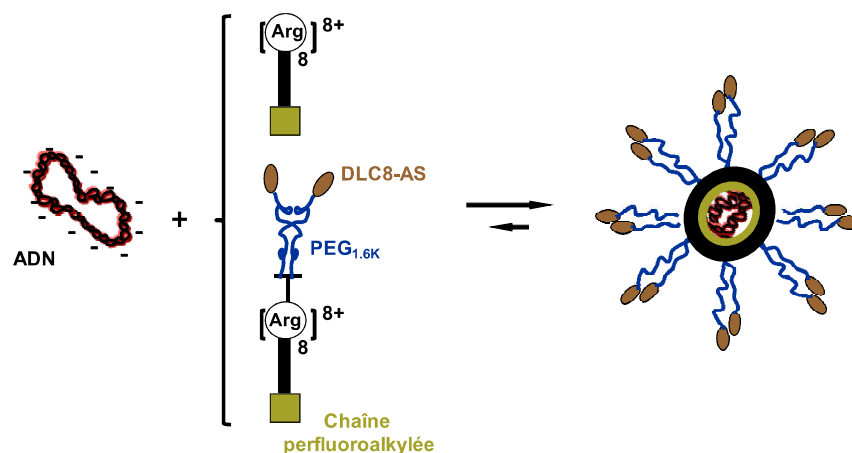


Figure 5 : Fonctionnalisation de NPs d'ADN basées sur des résidus arginine par des dimères de DLC8-AS

Il s'agit d'utiliser sur l'ADN de façon conjointe :

- un amphiphile polycationique et perfluoroalkylé comportant huit résidus arginine,
- un amphiphile polycationique et perfluoroalkylé à huit résidus arginine conjugué à un dimère de PEG_{1,6K}-DLC8-AS à son extrémité.

Alors que l'octaarginine devrait permettre une forte interaction avec les groupements phosphate de l'ADN pour former des NPs stables et fonctionnalisées par des séquences DLC8-AS, la chaîne perfluoroalkylée pourrait améliorer l'échappement endosomal des nanovecteurs par un effet lysomotropique.

Nous verrons finalement comment il est possible d'adapter cette stratégie à un système référence en transfert de gènes, le polyéthylène imine (PEI).

La **troisième partie** de ce mémoire est dédiée à la description des différents protocoles expérimentaux utilisés dans ce projet.

Une **conclusion générale** permet finalement de dresser un bilan des différents résultats obtenus, d'énoncer les retombés de notre travail et d'ouvrir la discussion sur les perspectives de recherche à venir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rosenberg, S. A.; Aebersold, P.; Cornetta, K.; Kasid, A.; Morgan, R. A.; Moen, R.; Karson, E. M.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Merino, M.; Culver, K.; Miller, D.; Blaese, M.; Anderson, W. F., Gene transfer into humans - Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* **1990**, 323, 570-578.
2. <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>, Indications addressed by gene therapy clinical trials. *J Gene Med, John Wiley and Sons* **2015**, consultation août 2015.
3. Miller, N., Glybera and the future of gene therapy in the European Union. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, 11, (5), 419-419.
4. Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: Chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem Soc Rev* **2012**, 41, (7), 2562-2574.
5. Parassol, N.; Bienvenu, C.; Boglio, C.; Fiorucci, S.; Cerezo, D.; Yu, X.-M.; Godeau, G.; Greiner, J.; Vierling, P.; Noselli, S.; Di Giorgio, C.; Van De Bor, V., In vivo characterization of dynein-driven nanovectors using drosophila oocytes. *PLoS ONE* **2013**, 8, (12), e82908.
6. Rapali, P.; Radnai, L.; Süveges, D.; Harmat, V.; Tölgyesi, F.; Wahlgren, W. Y.; Katona, G.; Nyitray, L.; Pál, G., Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PLoS ONE* **2011**, 6, (4), e18818.
7. Futaki, S.; Ohashi, W.; Suzuki, T.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Harashima, H.; Sugiura, Y., Stearilated arginine-rich peptides: A new class of transfection systems. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, (6), 1005-1011.

**PARTIE I : LA THERAPIE GENIQUE
ET LES VECTEURS DE TRANSFERT DE GENES**

I. INTRODUCTION A LA THERAPIE GENIQUE : LE GENE COMME MEDICAMENT

« Si l'on considère le but d'un médicament comme la restitution d'une fonction particulière du corps, alors l'ADN doit être tenu comme le médicament absolu. »¹

I.1 MALADIES GENETIQUES

L'être humain est un organisme pluricellulaire constitué de milliards de cellules différenciées en plusieurs centaines de types cellulaires différents. Il y a plus d'un demi-siècle, l'ADN ou acide désoxyribonucléique a été montré comme support de l'information génétique héréditaire responsable de cette diversité.² L'ADN est une macromolécule complexe située dans le noyau des cellules eucaryotes. L'unité structurale de l'ADN est le nucléotide, lui-même composé d'un désoxyribose, d'un groupement phosphate et d'une base azotée (guanine, cytosine, thymine ou adénine). L'enchaînement de deux chaînes antiparallèles de nucléotides appariés par leurs bases détermine une structure tridimensionnelle dite en « double hélice », élucidée par Watson et Crick, ce qui leur valut le prix Nobel de médecine en 1962.³ Un fragment de cette double hélice est l'unité fonctionnelle de base de l'information génétique : le gène. L'ensemble des gènes constitue le patrimoine génétique d'un être vivant (génome). Au cours de l'expression des gènes, l'information génétique portée par l'ADN conduit à la synthèse d'un ensemble de protéines fonctionnelles (protéome), qui assurent la majorité des fonctions et spécificités cellulaires et tissulaires. Le processus débute par la transcription d'un gène en ARN pré-messager qui subit ensuite plusieurs étapes de maturation pour donner naissance à un ARN messager (ARNm). L'étape finale de l'expression des gènes est la traduction qui conduit à la séquence d'acides aminés formant la protéine à partir de la séquence d'acides nucléiques constituant l'ARNm (**Figure 1**).

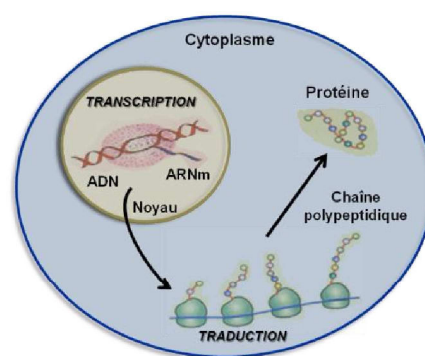


Figure 1 : Représentation simplifiée de la synthèse protéique

Au cours des multiples divisions cellulaires, le matériel génétique est théoriquement recopié à l'identique et chaque cellule reçoit le même génome avec près de 40 000 gènes estimés pour l'espèce humaine. Des mécanismes dits de réparation de l'ADN identifient, signalent et corrigent les dommages de l'ADN contribuant ainsi à maintenir la stabilité du génome. Toutefois, ces processus biochimiques ne sont pas infaillibles et des erreurs, ou mutations génétiques, peuvent subvenir. Ces

modifications sont extrêmement courantes et n'affectent que rarement l'intégrité des protéines produites. Elles peuvent toutefois entraîner des dysfonctionnements plus ou moins graves et sont à l'origine de maladies d'origine génétiques, héréditaires ou acquises. Ces maladies sont toutes dues à l'altération de la séquence initiale d'une partie codante du gène, qui va se traduire par la synthèse d'une protéine anormale ou l'absence d'une protéine indispensable. Les maladies dites monogéniques sont issues de l'altération d'un seul gène. Prenons l'exemple de la mucoviscidose, encore appelée fibrose kystique, qui se manifeste chez l'Homme essentiellement par l'épaississement des sécrétions au niveau des poumons. Cette maladie héréditaire d'évolution mortelle est la plus fréquente des maladies génétiques dans les populations de type caucasien, en touchant 1 enfant sur 2 à 3000 naissances, soit environ 300 à 500 nouveau-nés par an en France. Elle est provoquée par la délétion d'un seul acide aminé sur le gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Les maladies multifactorielles, quant à elles, impliquent très souvent la présence simultanée de nombreux allèles de gènes différents, ainsi que des facteurs environnementaux. Citons par exemple le cancer, maladie acquise qui représente la première cause de décès dans les pays développés. Les cancers se caractérisent par la prolifération anormalement rapide de cellules au sein d'un tissu de l'organisme conduisant à la formation de métastases. Ils sont le résultat de l'accumulation d'évènements mutationnels successifs, généralement des mutations acquises même si des mutations germinales sont impliquées dans un faible pourcentage de cas. Plusieurs gènes sont associés aux pathologies cancéreuses, à savoir principalement les oncogènes qui sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire, et les gènes suppresseurs de tumeurs dont l'inactivation serait liée à bons nombres de cas (exemple du gène suppresseur de tumeur p53 retrouvé muté dans plus de 50% des cancers humains). On dénombre à ce jour près de 6000 maladies d'origine génétique ; la plupart sont dites orphelines et n'ont aucun traitement curatif. Toutefois, la mise en évidence des mutations génétiques permet un diagnostic précoce de la maladie et l'élaboration de traitements palliatifs mieux adaptés.

I.2 THERAPIE GENIQUE ET « GENE MEDICAMENT »

L'avènement du génie génétique dans les années 1970, thématique qui regroupe l'ensemble des techniques de manipulation des génomes, représente l'une des principales avancées scientifiques du XX^e siècle. Les progrès notamment en termes de séquençage ont permis au projet Génome humain, achevé en avril 2003, de livrer une séquence complète et précise du génome humain. Ces travaux ont estimé le nombre de gènes codants à 22 000, ce qui représente moins de 2% du génome. Par la suite, le projet ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*), visant à étudier la fonction des gènes humains, a permis d'établir que 80% du génome serait fonctionnel, et notamment impliqué dans la régulation de l'activité des gènes. Il découle de ces résultats une meilleure compréhension des maladies, de leurs causes et de leur fonctionnement. Dans ce contexte, la thérapie génique a vu le jour dans les années 1980, et s'est imposée comme une alternative

innovante au traitement des maladies dites génétiques. Son principe est, *a priori*, simple puisqu'il s'agit d'introduire un gène dit « médicament » dans des cellules cibles afin de faire exprimer les protéines thérapeutiques pour éliminer ou réparer un dysfonctionnement génétique (**Figure 2**).

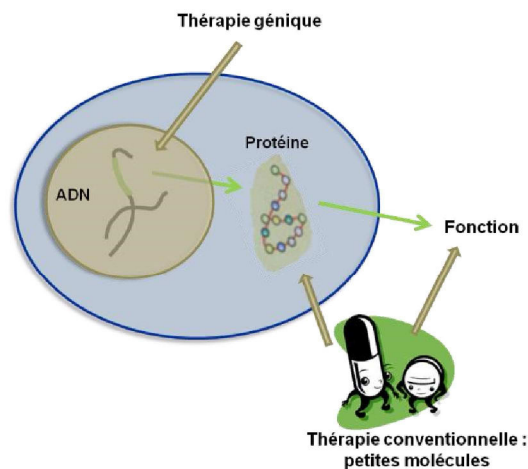


Figure 2 : Principe de la thérapie génique

Alors que les thérapies conventionnelles proposent un traitement palliatif des symptômes de la maladie, la thérapie génique intervient plus en amont, à la source même du dysfonctionnement.⁴ Ainsi, elle permet de s'affranchir des pics de concentration liés à l'injection répétée de protéines, diminuant le risque de toxicité et de désensibilisation des récepteurs. En théorie, la protéine est sécrétée de façon stable et prolongée après administration unique d'acide nucléique, permettant d'obtenir des effets bénéfiques sur une période plus longue. Aussi, la thérapie génique représente un espoir puisqu'elle laisse envisager la possibilité de proposer un traitement curatif pour toutes sortes de maladies génétiques. En effet, même si la réparation de gènes fut l'une des premières applications envisagées,⁵ elle a trouvé un fort potentiel d'application dans le cadre des maladies acquises comme les cancers, les maladies neurodégénératives ou infectieuses (hépatites, SIDA).⁴ Depuis quelques années, elle est définie comme l'administration thérapeutique ou expérimentale chez l'Homme de matériels génétiques, ADN ou ARN.⁶ Toutefois, même si la thérapie génique repose sur un principe en théorie simple, son succès nécessite la mise au point de vecteurs efficaces et non toxiques pour transférer le matériel génétique d'intérêt dans les cellules cibles. En effet, même si le choix de l'acide nucléique thérapeutique est rendu possible par les avancées en séquençage génomique,⁷ son transfert jusqu'au noyau cellulaire reste problématique. L'ADN et l'ARN sont des macromolécules polyanioniques qui ne peuvent franchir seules les barrières physiologiques de l'organisme et nécessitent d'être vectorisées pour évoluer du site d'administration jusqu'au site d'action.

Outre ces aspects techniques, la thérapie génique a nécessité avant toute application clinique une évaluation des risques liés à l'utilisation d'un gène comme médicament, et le vote de diverses lois. Les principaux risques sont en effet associés à :

- l'utilisation de nouveaux outils comme les techniques de l'ADN recombinant,
- la modification génétique associée aux dérives eugénistes,
- l'utilisation de vecteurs dérivés d'organismes pathogènes.

Les aspects réglementaires et de sécurité concernent alors :

- la recherche expérimentale et préclinique,
- la manufacture des produits,
- le développement des essais cliniques,
- l'autorisation de mise sur le marché.

Au niveau international, la thérapie génique germinale a été interdite par soucis d'éthique, pour écarter les risques de transmettre des modifications génétiques sur plusieurs générations.⁸ Aussi, l'application des réglementations concernant les essais cliniques s'est renforcée suite au décès d'un jeune patient de 18 ans en 1999 à cause de multiples négligences au niveau du protocole suivi.⁹ Ainsi, comme dans toute autre approche thérapeutique, la décision de recourir à une thérapie génique requiert une évaluation du risque encouru par rapport au bénéfice escompté.

I.3 BREF HISTORIQUE DES ESSAIS CLINIQUES

Tableau 1 : Quelques essais cliniques de thérapie génique

Année	Maladie	Vecteur	Remarque	Référence
1989	Mélanome avancé	Rétroviral	1 ^{er} protocole clinique sur l'Homme	10
	ADA-SCID			
1995	Déficit immunitaire combiné sévère par déficience en adénosine désaminase	Rétroviral	Persistance du vecteur plusieurs mois	11
1999	OTC Déficit en ornithine transcarbamylase	Adénoviral	1 ^{er} échec : décès de Jesse Gelsinger	9
2000	X1-SCID Déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X	Rétroviral	1 ^{er} vrai succès → Leucémies chez 4 patients sur 10	12, 13
2004	Cancer de la vessie	Polymère PEI	Rémission tumorale > 85%	14
2008	Amaurose congénitale de Leber	AAV	Amélioration de la sensibilité rétinienne durable	15, 16
2009	X-ALD Adrénoleucodystrophie liée à l'X	Lentiviral	Effets bénéfiques	17
2012	Déficit en lipoprotéine lipase	AAV	1 ^{ère} thérapie génique approuvée en Europe (Glybéra)	18
2014	Parkinson	Lentiviral	Essai clinique phase I/II Amélioration des symptômes moteurs	19
2014	X1-SCID	Rétroviral amélioré	Efficace → Effets à long terme inconnus	20
2015	Mucoviscidose	Liposome	Essai clinique phase II Stabilisation des symptômes pulmonaires	21

A ses débuts, la thérapie génique était destinée à lutter contre les maladies monogéniques, c'est-à-dire liées à la dysfonction d'un seul gène. En réalité, le champ d'application est beaucoup plus large. A ce jour, on recense plus de 2000 essais cliniques réalisés ou en cours dans 36 pays différents, dont 52 en France. La grande majorité des protocoles concerne les cancers (près de 65%) puisqu'ils représentent un problème majeur de santé publique. Les maladies monogéniques (10%), infectieuses (8%) et cardio-vasculaires (8%) viennent ensuite (**Figure 3**).²²

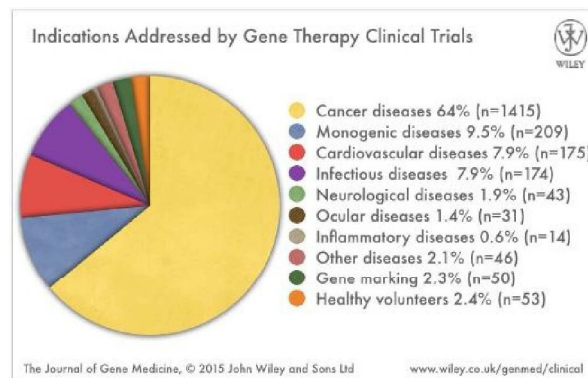


Figure 3 : Répartition du pourcentage de protocoles cliniques par maladie²²

II. STRATEGIES DE THERAPIE GENIQUE

II.1 DIFFERENTS MODES D'ADMINISTRATION

Parallèlement aux expérimentations *in vitro* de transfert de gènes dans les cellules en culture, différents protocoles d'administration existent suivant le type de maladie dont souffrent les patients, ainsi que l'organe/tissu cible. Les cellules somatiques peuvent être modifiées génétiquement suivant deux stratégies principales, à savoir la thérapie génique *in vivo* et la thérapie génique *ex vivo* (**Figure 4**).

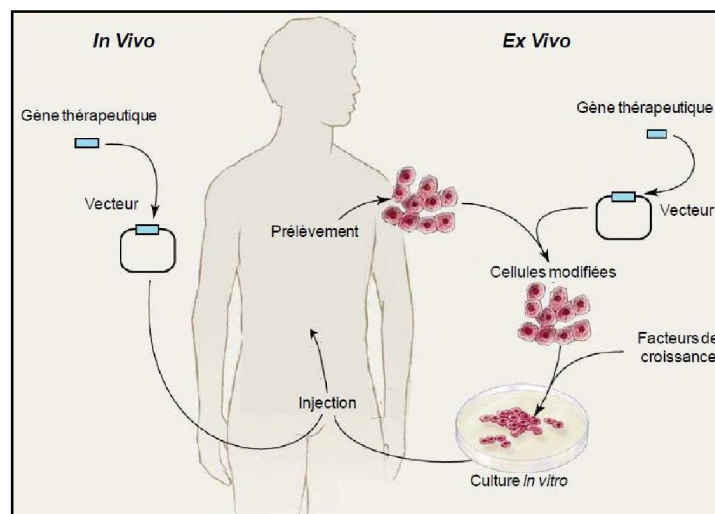


Figure 4 : Modes d'administration de gènes à visée thérapeutique, modifié d'après²³

La thérapie génique *ex vivo*, basée sur la technique de transplantation cellulaire, est la plus couramment utilisée dans les essais cliniques.^{12, 17} La méthode consiste à prélever les cellules cibles du patient, à les modifier en conditions de culture cellulaire avec une combinaison acide nucléique/vecteur, puis à les réimplanter (après amplification) chez le sujet malade. Cette stratégie est applicable à tous types de tissus transplantables, et s'est révélée efficace pour transfecter de nombreux types cellulaires (hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules souches). Elle permet aussi de s'affranchir des nombreux obstacles liés au trafic extracellulaire. Néanmoins, même si relativement simple à mettre en œuvre, cette technique reste couteuse, de part les différentes technologies employées (chirurgie, culture cellulaire).

L'approche *in vivo* consiste à administrer directement le gène thérapeutique (couplé ou non à un vecteur) au patient, soit par voie systémique (injection intraveineuse ou intraartérielle), soit par délivrance locale (injection directe dans un tissu ou une tumeur, aérosol). L'efficacité de cette stratégie est fortement compromise par les multiples obstacles physiologiques que rencontrent les acides nucléiques pour atteindre leur cible. Par ailleurs, l'expression du transgène est souvent diffuse par manque de spécificité (cas d'une injection par voie systémique), ou à l'inverse localisée au niveau du site d'injection. Elle est aussi bien souvent transitoire et nécessite des injections répétées pour obtenir, ou maintenir l'effet thérapeutique escompté. Pour autant, ce type de protocole présente l'avantage de ne pas exiger d'intervention chirurgicale.

II.2 DIFFERENTES STRATEGIES DE TRANSFERT DE GENES

Les applications de thérapie génique requièrent une mise au point plus ou moins délicate suivant l'anomalie à corriger. Lorsque celle-ci touche des cellules hautement différenciées, alors elles sont les seules cibles possibles (exemple de la β -thalassémie). Le cas est plus simple lorsque la fonction cellulaire est moins spécialisée. La communauté scientifique a envisagé différentes stratégies de réparation ou de supplémentation en fonction des mécanismes biologiques à l'origine des maladies et de leurs origines génétiques ou acquises. Nous dressons ici une liste non exhaustive des stratégies existantes en fonction du type de maladie.

II.2.1 MALADIES MONOGENIQUES HEREDITAIRES

L'addition de gène est encore aujourd'hui l'approche dominante envisagée pour traiter les maladies monogéniques. La conséquence de ces affections est la perte de fonction du gène muté, entraînant un déficit en la protéine correspondante. L'apport du gène thérapeutique dans la cellule permet ainsi de compenser la synthèse protéique manquante et de réparer de l'activité génétique. Les maladies concernées par cette stratégie sont par exemple la mucoviscidose qui provient du dérèglement de la protéine CFTR,²⁴ la myopathie de Duchenne qui résulte de la mutation du gène de la dystrophine²⁵ ou encore l'immunodéficience héréditaire combinée sévère liée à un déficit en adénosine désaminase.²⁶

Dans certains cas une mutation génétique a pour conséquence un gain de fonction. Les symptômes de la maladie résultent alors de la production d'une protéine anormale à effets délétères. On attend cette fois de la thérapie génique qu'elle inhibe l'expression du gène muté, ou qu'elle corrige les effets de son expression en produisant une protéine « compensatrice ».

II.2.2 CANCERS²⁷

La thérapie génique est une piste très sérieuse en cancérologie, pour être utilisée simultanément ou à la suite des traitements classiques. En effet, dans près d'un tiers des cas, la triade chirurgie-chimiothérapie-radiothérapie ne permet pas d'éradiquer totalement la tumeur. Plusieurs approches sont envisagées qui consistent à :

- stimuler la réponse immunitaire²⁸

L'immunothérapie a pour but d'augmenter l'antigénicité des cellules cancéreuses ainsi que la réactivité du système immunitaire de l'hôte. La thérapie génique intègre dans les cellules tumorales des gènes codant pour des protéines qui stimulent le système immunitaire (cytokines, antigènes tumoraux, molécules du complexe majeur d'histocompatibilité...).

- induire la mort cellulaire (stratégie du gène suicide)²⁹

L'objectif est de programmer la mort cellulaire soit en introduisant un gène apoptotique, soit indirectement en sensibilisant les cellules cancéreuses à des médicaments. Dans ce second cas, il s'agit d'injecter dans les cellules tumorales un gène codant pour une enzyme capable de transformer une prodrogue non toxique administrée au patient en une drogue cytotoxique. Le médicament actif détruit alors les cellules cancéreuses. Le premier système développé en ce sens utilise le gène de la thymidine kinase du virus Herpes simplex de type 1 (HSV1-TK). L'enzyme, une fois exprimée, rend les cellules transfectées sensibles à des médicaments antiherpétiques tels que le ganciclovir.³⁰

- agir sur les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur³¹

La thérapie génique vise à inactiver des oncogènes ou alors à rétablir la fonction de gènes suppresseurs de tumeur. Dans ce dernier cas, un exemple repose sur le transfert du gène p53.³² L'expression intracellulaire de la forme sauvage de ce gène conduit à la mort apoptotique des cellules tumorales. La forme mutée, inactive, est fréquemment retrouvée dans les cancers humains. La stratégie consiste alors à introduire un gène p53 normal dans les cellules cancéreuses pour bénéficier d'un effet antiprolifératif. Le premier produit de thérapie génique approuvé pour une utilisation clinique sur l'Homme est un adénovirus portant le gène suppresseur de tumeur p53. Homologué en Chine en 2003 sous le nom de Gendicine, il est utilisé dans le traitement des cellules squameuses cancéreuses de la tête et du cou.^{33, 34}

II.2.3 MALADIES INFECTIEUSES

En ce qui concerne la thérapie génique des maladies virales, et avant tout de l'infection par le VIH,³⁵ une approche principale se dégage qui vise à induire une immunisation intracellulaire. Cette stratégie a pour objectif de conférer aux cellules transduites une résistance à l'infection en leur faisant exprimer un gène antiviral. Les principales cibles sont les cellules souches hématopoïétiques et les lymphocytes T CD4+. Les protocoles sont basés sur la transplantation de ces cellules génétiquement modifiées pour l'expression d'une protéine antivirale ou d'un ARN interférant (ARNi). Les protéines antivirales sont choisies pour interférer soit avec l'entrée du virus dans la cellule (inhibiteurs de fusion), soit avec son cycle de réplication. En ce qui concerne les approches ARNi (siARN ou shARN), elles permettent de cibler soit les ARNm des protéines virales (Tat ou Rev) soit les ARNm des récepteurs CD4, CCR5, CXCR4 reconnus par le VIH. Une dernière stratégie plus récente, surnommée VIP (*Vectored ImmunoProphylaxis*), consiste à induire une immunisation permanente par injection d'un vecteur viral codant des anticorps neutralisants anti-VIH.³⁶

Les chimiothérapies antivirales classiques améliorent la qualité de vie des patients mais sont très fréquemment accompagnées de multiples effets secondaires et de phénomènes de résistance. Par ailleurs, le virus n'est pas complètement éradiqué et reste à l'état latent dans l'organisme. La thérapie génique pourrait théoriquement dépasser ces limitations et conduire à un traitement curatif du VIH.

II.3 THERAPIE GENIQUE OU DELIVRANCE D'ACIDES NUCLEIQUES

Le potentiel de la thérapie génique est aujourd'hui connu du grand public. Toutefois, de nombreux obstacles restent à franchir pour en faire une solution thérapeutique de premier choix. Les acides nucléiques tels que les ADN ou les ARN sont des macromolécules hydrophiles et polyanioniques. Ces propriétés physicochimiques ne les prédisposent pas à diffuser passivement à travers la membrane cellulaire, bicouche lipidique lipophile et plutôt anionique. Aussi, les AN ont une durée de vie limitée dans les milieux extra- et intracellulaires, puisqu'ils sont rapidement dégradés probablement par action des nucléases. Pour exemple, le temps de demi-vie de l'ADN dans le sérum est situé entre 1,2 et 21 min,³⁷ et il n'excède pas 90 min dans le cytosol.³⁸ L'utilisation d'AN nu en thérapie génique a fait l'objet de publications,^{39, 40} mais reste limitée à certains tissus spécifiques (muscle, yeux) et aux cellules adjacentes à l'injection. Ainsi, pour protéger les AN de l'environnement enzymatique, on utilise communément des vecteurs de transfert de gènes qui peuvent être viraux ou non viraux. Les vecteurs doivent être capables de condenser les AN en nanoparticules stables, monodisperses et de taille la plus petite possible pour faciliter leur diffusion dans les fluides biologiques. Le protocole de formulation (**Etape 1, Figure 5**) doit aussi être simple à mettre en œuvre, reproductible et présenter une bonne tolérance biologique. Finalement, les nanoparticules doivent pouvoir surmonter les nombreux obstacles qui jalonnent leur parcours *in vivo* depuis le site

d'administration jusqu'au site d'action, puis permettre l'expression des séquences transportées. Ainsi, même si l'utilisation de systèmes vecteurs est indispensable au succès de la thérapie génique, ce dernier dépend de leur capacité à s'affranchir des différentes barrières rencontrées (**Figure 5**).

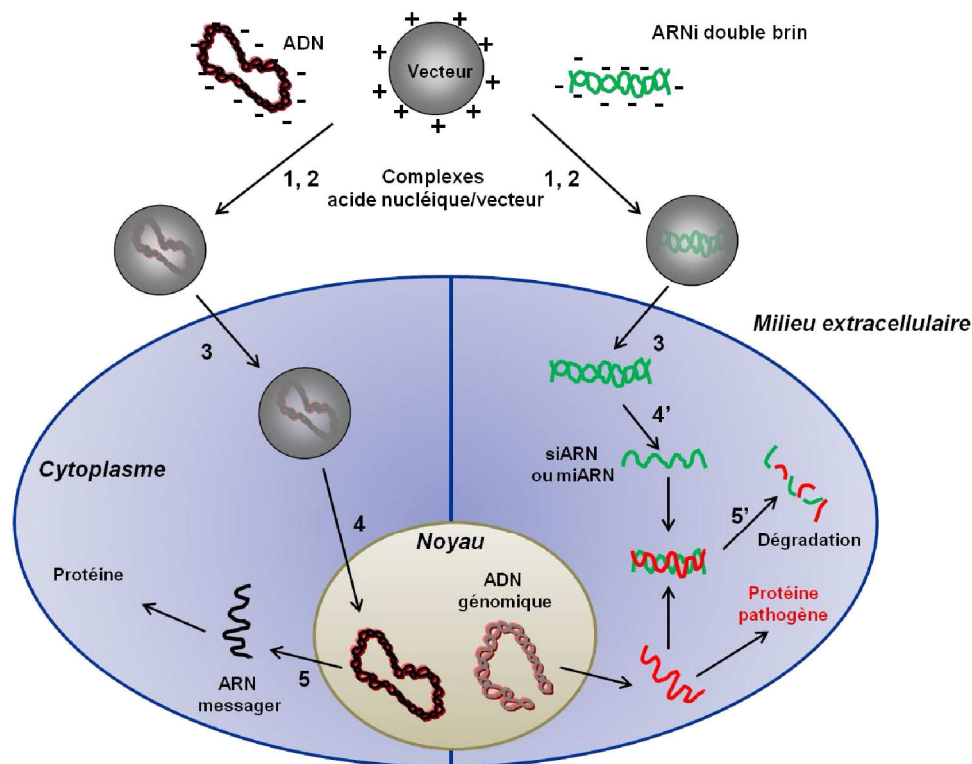


Figure 5 : Etapes majeures et barrières qui jalonnent le transfert des AN

Les obstacles au transfert des acides nucléiques concernent :

- leur trafic extracellulaire depuis le site d'administration jusqu'à la cellule cible (**Etape 2**)
- leur pénétration dans la cellule (**Etape 3**)
- leur trafic intracellulaire (**Etape 4**) qui comprend :
 - ✓ **dans le cas d'un ADN :** migration vers le noyau, pénétration au travers de la membrane nucléaire, dissociation du système vecteur/ADN, mise à profit de la machinerie cellulaire de l'hôte pour assurer la transcription en ARNm puis la traduction en protéines thérapeutiques (**Etape 5**)
 - ✓ **dans le cas d'un ARN :** libération dans le cytoplasme, dissociation de l'ARNi double brin en ARN simple brin antisens (siARN ou miARN), association à l'ARNm pathogène puis inhibition de la traduction en protéines pathogènes (**Etape 5'**).

Dans le prochain chapitre, nous développerons les outils du transfert de gènes, c'est-à-dire les différents systèmes envisagés jusqu'à présent pour permettre une expression thérapeutique optimale.

III. OUTILS DU TRANSFERT DE GENES

Un vecteur idéal doit satisfaire aux critères suivants :⁴¹

- être facile à produire en quantité suffisante par des procédés sécurisés à moindres coûts,
- être non immunogène et permettre des administrations répétées,
- entraîner une production stable ou régulée de la protéine d'intérêt,
- présenter une spécificité tissulaire ou cellulaire,
- transporter des acides nucléiques sans limitation de taille,
- être capable d'infecter tant les cellules quiescentes que les cellules en division
- avoir un devenir déterminé soit en s'intégrant au génome de la cellule hôte, soit en restant en position épisomale (pas d'intégration aléatoire).

Malgré l'intensification des recherches sur l'élaboration de systèmes plus performants, le vecteur « idéal et universel » reste à découvrir. Il existe deux grandes familles de vecteurs de transfert d'AN, à savoir les vecteurs viraux qui restent aujourd'hui les plus utilisés dans les essais cliniques,⁴² et les vecteurs synthétiques ou non viraux. Soulignons également l'existence de vecteurs hybrides basés sur des structures virales et non virales,⁴³ et de vecteurs bactériologiques.^{44, 45} Parallèlement à ces familles de vecteurs, il existe des méthodes physiques de transfert de gènes, que nous ne décrirons que succinctement. Outre l'amélioration des structures vectorisantes, une autre alternative pour augmenter l'efficacité d'expression du transgène réside dans l'optimisation des constructions plasmidiques elles-mêmes.⁴⁶

Dans cette étude bibliographique, nous nous attarderons principalement (sans pour autant être exhaustifs) sur l'utilisation de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes, thématique largement étudiée au laboratoire et qui fait l'objet de cette thèse.

III.1 THERAPIE GENIQUE VIRALE⁴⁷

Les virus sont des entités biologiques élaborées capables d'infecter avec une grande efficacité de nombreux types cellulaires. Véritables vecteurs naturels, ils possèdent les outils nécessaires pour accéder au noyau des cellules hôtes, y transférer leur matériel génétique, et détourner la machinerie cellulaire pour leur réplication. Ces prédispositions acquises durant leur longue évolution en ont fait des outils de choix pour le transfert de gènes exogènes. Les vecteurs viraux dérivés des virus naturels ont été utilisés dans plus de 70% des protocoles cliniques, et constituent encore aujourd'hui la plus grande classe de vecteurs de thérapie génique.⁴² L'obtention de vecteurs viraux implique la modification du virus par génie génétique. Le virus est « sécurisé » par délétion des séquences responsables de son pouvoir pathogène, et le génome est reconstruit par insertion du gène d'intérêt thérapeutique. Pour pouvoir transgresser les barrières de l'organisme, la

particule virale modifiée conserve les protéines nécessaires à la pénétration cellulaire et à l'internalisation dans le noyau (protéines de capsid, peptide de localisation nucléaire). Deux classes principales de virus ont servi au développement des vecteurs viraux : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique au génome de la cellule hôte (rétrovirus, lentivirus et virus adéno-associés), et ceux qui ne l'intègrent pas (adénovirus et virus herpétique).

III.1.1 VIRUS INTEGRATIFS

- Rétrovirus⁴⁸

Les rétrovirus sont à l'origine de graves pathologies humaines telles que certains cancers (carcinomes, leucémies etc...), ou encore le SIDA (« Syndrome d'Immunodéficience Acquise »). Le patrimoine génétique des rétrovirus est constitué d'un dimère d'ARN. L'infection rétrovirale implique donc une étape de rétrotranscription de l'ARN en ADN proviral sous l'action d'une enzyme spécifique, la transcriptase inverse. Après pénétration dans le noyau, l'ADN s'insère de façon aléatoire dans le génome de la cellule infectée. La capacité des rétrovirus à s'intégrer au patrimoine génétique de l'hôte a été exploitée pour le développement de vecteurs de transfert de gènes. Les vecteurs rétroviraux permettent une expression maintenue du transgène dans le temps. Alors que l'infection n'est pas probante *in vivo*, les essais menés *ex vivo* ont conduit à de hautes efficacités de transduction. Aussi, l'absence quasi totale de gènes viraux dans le génome inséré engendre une faible immunogénicité. Les vecteurs rétroviraux ont été utilisés dans les premiers protocoles cliniques de thérapie génique sur l'homme. En 1995, le déficit immunitaire ADA-SCID a été traité par une thérapie génique *ex vivo* avec un vecteur dérivé du virus de la leucémie murine (*Murine Leukemia Virus*, MLV).¹¹ Ce type de vecteur est également à l'origine du premier vrai succès de la thérapie génique : la correction d'un défaut génétique chez des patients atteints d'immunodéficience combinée sévère liée au chromosome X.¹² Toutefois, les leucémies survenues chez certains sujets soulignent le risque de mutagénèse liée à une insertion aléatoire du transgène dans l'ADN de l'hôte. Par ailleurs, les vecteurs rétroviraux ne peuvent infecter que des cellules en division et la taille des inserts est limitée à environ 8 kb. Ces particularités réduisent considérablement leur champ d'application.

Cas particulier des lentivirus⁴⁹

Une alternative largement étudiée à l'heure actuelle est le développement de vecteurs rétroviraux dérivés des lentivirus. Les lentivirus sont dotés de signaux de localisation nucléaire qui leur permettent de franchir la membrane nucléaire en l'absence de mitose. Ainsi, ils sont capables d'infecter aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en prolifération. Ces propriétés ouvrent le champ d'application des vecteurs rétroviraux aux cellules du système nerveux central, aux cellules rétinienne ou encore aux cellules hépatiques. Les vecteurs lentiviraux sont pour la plupart issus du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Récemment, leur utilisation a conduit à des résultats très

encourageants dans le traitement de patients atteints d'adrénoleucodystrophie liée à l'X,⁵⁰ de leucémie lymphoïde chronique,⁵¹ ou encore du VIH.⁵² Les vecteurs lentiviraux semblent donc prometteurs bien qu'il reste d'importants obstacles à surmonter comme des problèmes de production à grande échelle ou de sécurité. En effet, bien que les lentivirus semblent avoir un profil d'intégration génomique plus sûr que les rétrovirus classiques, le risque de mutagénèse insertionnelle subsiste.

- Virus adéno-associés (AAV)⁵³

Les virus adéno-associés sont de petits virus à ADN linéaire simple brin qui appartiennent à la famille des parvovirus. Bien que non pathogènes pour l'Homme, ils sont susceptibles de transduire un très large panel de types cellulaires, que les cellules soient quiescentes ou en division. Ces propriétés en font des entités biologiques de choix pour le développement de vecteurs de transfert de gènes. Les vecteurs issus de virus adéno-associés sont capables de s'intégrer à l'ADN cellulaire. Ils permettent ainsi une expression du transgène efficace et prolongée dans des tissus divers et variés tels que le muscle, le foie, la rétine ou encore le cerveau. De plus, ils expriment peu d'information d'origine virale et sont donc faiblement immunogènes. Néanmoins, ces vecteurs viraux possèdent des inconvénients majeurs. La capside virale limite la taille du transgène à environ 5 kb pour une expression optimale,⁵⁴ et ils sont difficilement produits à grande échelle. Aussi, la sécurité de ces vecteurs est à relativiser puisque leur caractère intégratif peut potentiellement provoquer une activation ou une inhibition des gènes voisins.⁵⁵ Outre ces limitations, les vecteurs AAV restent des outils efficaces retrouvés dans de nombreux tests cliniques. Ils ont notamment connus de récents succès pour le traitement de maladies neurologiques comme Parkinson ou Alzheimer.⁵⁶ Finalement, il faut noter que le seul médicament de thérapie génique autorisé en Europe (Glybera) utilise ce type de vecteur pour prévenir des attaques pancréatiques graves.^{18, 57}

III.1.2 VIRUS NON INTEGRATIFS

- Adénovirus⁵⁸

Les adénovirus sont des virus à ADN linéaire double brin dont le génome s'étend de 36 à 40 kb. Ils présentent un large tropisme cellulaire, et infectent aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en division. Après pénétration du virus dans la cellule par endocytose, l'ADN viral est importé dans le noyau où il ne s'intègre pas au patrimoine génétique de l'hôte. Ces virus sont à l'origine d'infections bénignes chez l'Homme (conjonctivites, pharyngites, gastroentérites...), et présentent donc une faible pathogénicité. Les vecteurs issus des adénovirus présentent de multiples avantages. Selon les générations, ils sont capables de transporter des inserts allant de 7 à 35 kb. Leur production en laboratoire est relativement aisée et de hauts niveaux d'expression du transgène peuvent être obtenus *in vitro* et *in vivo*. A l'heure actuelle, ce sont les outils les plus employés dans les protocoles cliniques de thérapie génique (506 essais lancés soit plus de 22% des protocoles cliniques),⁴²

principalement dans le cadre de stratégies antitumorales.⁵⁹ En 2003, ces travaux ont abouti à la commercialisation en Chine du premier produit de thérapie génique, la Gendicine.³⁴ Toutefois, l'expression du transgène reste transitoire puisque ces systèmes sont non intégratifs. Cela évite cependant le risque de mutagenèse insertionnelle. Le principal inconvénient lié à l'utilisation de ces vecteurs reste leur forte immunogénicité. L'expression résiduelle de protéines virales peut induire une réponse immunitaire entraînant l'élimination des cellules transfectées, et l'inhibition de l'effet thérapeutique. Dans un cas extrême, l'injection à forte dose d'un vecteur adénoviral associée à une réaction immunitaire massive a conduit au décès de Jesse Gelsinger en 1999.⁹

- Virus Herpes Simplex de type 1⁶⁰

Le virus herpes simplex de type 1 (VHS-1) est constitué par une molécule d'ADN linéaire bicaténaire. Des études ont estimé que plus de 85% de la population mondiale est séropositive pour le VHS-1, pourtant peu pathogène pour l'Homme.⁶¹ Ce virus présente un tropisme naturel pour les cellules neuronales, ce qui en fait un candidat particulièrement attractif pour le transfert de gènes dans le système nerveux. Les vecteurs dérivés du VHS-1 présente une capacité de vectorisation incomparable à tout autre vecteur (> 100 kb), et peuvent rester à l'état latent dans les cellules infectées permettant une expression prolongée et efficace du transgène. Aussi, le risque mutagène est faible puisqu'il n'y a pas d'insertion du génome viral à l'ADN de l'hôte. Malgré ces nombreux avantages, les protocoles cliniques impliquant ces vecteurs restent anecdotiques (seulement 3%).⁴² Ils concernent très majoritairement des stratégies antitumorales, même si des études précliniques ont mis en avant leur potentiel sur les maladies neurodégénératives telles que Parkinson.⁶² Les limitations majeures de ces systèmes reposent sur des problèmes de production et de toxicité (reprise de la réplication). Récemment, le développement de vecteurs HSV-1 appelés amplicons, qui sont non réplcatifs et totalement dépourvus de gènes viraux, a permis d'améliorer la sécurité de tels systèmes.⁶³

III.1.3 BILAN SUR LES VECTEURS VIRAUX

Malgré certains succès indéniables, les vecteurs viraux n'ont pas répondu à toutes les attentes et les inclure dans des applications cliniques n'est pas sans danger. La manipulation de particules virales est associée à un risque non négligeable de réactions immunitaires, et de transformation maligne des cellules transduites. Les recherches se heurtent aussi aux coûts et aux difficultés de manipulation de ces produits biologiques. Finalement, les caractéristiques intrinsèques du virus à l'origine du vecteur, à savoir taille et tropisme cellulaire, réduisent son champ d'application. Ainsi, parallèlement à la mise au point de nouveaux vecteurs viraux, les recherches se sont accentuées sur le développement de stratégies non virales de transfert de gènes, avec les méthodes physiques et les vecteurs synthétiques.

III.2 THERAPIE GENIQUE NON VIRALE

Contrairement à la thérapie génique virale, les méthodes non virales de transfert d'acides nucléiques limitent les risques liés à l'injection d'un virus, et sont sans doute plus facilement transposables à l'échelle industrielle. Les constructions non virales sont constituées d'AN « nu » ou complexé, le transfert pouvant être réalisé grâce à des méthodes physiques ou par le biais de constructions chimiques.

III.2.1 METHODES PHYSIQUES⁶⁴

Injection directe d'ADN ou d'ARN « nu »

En plus d'être la méthode la plus simple, c'est probablement celle qui génère le moins d'effets secondaires puisqu'elle élimine les problèmes de toxicité liés à l'utilisation de vecteurs viraux ou synthétiques. Toutefois, cette technique conduit à une faible et brève expression du transgène dans le tissu traité. C'est pourquoi de nombreuses techniques dites « physiques » ont été développées pour favoriser l'entrée des AN dans les tissus ou organes cibles, et en améliorer l'expression.

Injection hydrodynamique⁶⁵

Il s'agit d'injecter très rapidement sous pression, par voie systémique, un volume d'une solution d'AN au moins égal au volume sanguin total de l'animal. Sous cet effet, on observe une pénétration et une activité des AN nettement améliorée, essentiellement localisée au niveau des muscles ou des organes internes (foie, poumons, rate...). Les limitations de cette méthode, dues au large volume de liquide injecté, l'ont longtemps cantonné à l'expérimentation sur de petits animaux (souris, rats). Des innovations techniques ont par la suite permis l'expérimentation sur de plus gros animaux tels le porc⁶⁶ ou le chien.⁶⁷ Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement sophistiqué contrairement aux autres méthodes physiques de transfert de gènes. Elle requiert néanmoins d'importantes mises au point avant d'être applicable à l'Homme sans danger.

Biolistique ou « *gene gun* »

Il s'agit d'adsorber de l'ADN « nu » sur des particules métalliques microscopiques et biocompatibles (telles que l'or ou le tungstène), et de les propulser sur les tissus cibles grâce à un dispositif contenant un gaz sous pression. Cette technique, initialement destinée à la transfection de cellules végétales, a été étendue aux cellules et tissus de mammifères au début des années 1990. Elle permet la pénétration directe de l'ADN dans le cytosol ou le noyau, et évite certains obstacles rencontrés lors du trafic extra- ou intracellulaire. Le principal inconvénient de cette approche réside dans la possible toxicité à long terme liée à l'accumulation de particules métalliques dans le corps. Une alternative consiste à utiliser des billes polymériques à base de chitosan, permettant, *a priori*, d'obtenir des résultats similaires aux particules métalliques tout en étant plus biocompatibles.⁶⁸ Une autre limitation est liée à la faible pénétration des particules dans les tissus, qui n'excède pas 0,5 mm de

profondeur. Cette technique reste alors principalement envisagée pour le traitement de maladies touchant des tissus aisément accessibles tels que la peau (vaccination à ADN⁶⁹) et la cornée.⁷⁰

Electroporation⁷¹

Une impulsion électrique de courte durée permet d'induire une électroperméabilisation transitoire des membranes cellulaires sans dommage pour la cellule traitée. Cette technique facilite la pénétration cellulaire de l'ADN dans de nombreux tissus et organes (muscles, peau, tumeurs, cornée, cerveau, ovaires...). Son efficacité dépend de différents paramètres tels que la puissance et la durée de l'impulsion électrique appliquée, ou encore la taille et la géométrie des cellules visées. Elle a été appliquée chez l'Homme dans plusieurs protocoles cliniques ciblant notamment le mélanome.⁷²

Sonoporation⁷³

Cette technique consiste à utiliser des ultra-sons (US) pour induire une perméabilité transitoire de la membrane cellulaire et faciliter l'internalisation de grosses molécules. Elle permet d'améliorer le transfert d'ADN nu dans de nombreux tissus et organes (muscles, foie, reins, tumeurs solides, peau...), ainsi que la transfection d'ADN complexé par exemple avec du polyéthylène imine (PEI).⁷⁴ Son efficacité dépend de différents facteurs qui sont entre autres l'intensité et la fréquence des US utilisés, et la durée d'exposition. L'ADN est en général co-injecté avec un agent de contraste contenant des microbulles formées par exemple de perfluoropropane encapsulé dans une sphère d'albumine humaine (OptisonTM, GE Healthcare). Le mécanisme de sonoporation n'est pas totalement élucidé mais pourrait faire intervenir le phénomène dit de « cavitation acoustique ». Les US provoqueraient l'apparition de bulles au sein du liquide qui, en implosant, créeraient une perturbation mécanique associée à une libération d'énergie entraînant la perméabilisation des cellules avoisinantes. Cette approche a plusieurs avantages puisqu'elle est non-invasive et permet d'atteindre des organes profonds sans chirurgie. L'une des limitations est la possible altération du cytosquelette qui menace de ce fait le trafic intracellulaire de l'ADN.

Bilan sur les méthodes physiques

Le choix de l'une de ces méthodes physiques dépend essentiellement de l'application thérapeutique envisagée. Ces méthodes assurent le transfert de l'ADN directement dans le cytoplasme, mais l'efficacité de transfection demeure dépendante de sa capacité à atteindre et pénétrer le noyau. Même si dans certains cas un transport nucléaire a été obtenu, l'association de ces méthodes à d'autres stratégies comme l'utilisation de complexes d'ADN peut permettre d'en améliorer l'efficacité. Finalement, les inconvénients majeurs de ces techniques restent leur nature invasive et la difficulté à atteindre des tissus profonds.

III.2.2 METHODES CHIMIQUES : VECTEURS SYNTHETIQUES^{75, 76}

Etant donnés les inconvénients majeurs liés à l'utilisation des vecteurs viraux, ainsi que les limitations des méthodes physiques, les recherches se sont concentrées sur la mise au point de vecteurs obtenus chimiquement. A ce jour, il en existe une multitude, essentiellement de nature (poly)cationique lipidique ou polymérique. La complexation se fait alors par le biais d'interactions électrostatiques avec les phosphates anioniques des acides nucléiques. Il en résulte l'obtention de nanoparticules denses suffisamment petites pour être prises en charge par la cellule. Ces objets sont nommés lipoplexes ou polyplexes⁷⁷ suivant la nature lipidique ou polymérique du vecteur, respectivement. En fonction du rapport molaire N/P utilisé, à savoir la quantité d'amines de l'agent cationique sur la quantité d'équivalents phosphate de l'AN, les particules portent une charge globale négative, neutre ou positive. La taille des complexes formés est aussi dépendante des conditions de formulation (concentration en AN, pH, rapport N/P...) ainsi que de la nature du vecteur cationique.

III.2.2.1 SYSTEMES LIPIDIQUES (POLY)CATIONIQUES ET LIPOPLEXES

Les liposomes ont été les premiers systèmes utilisés, au cours des années 1980, pour transférer un matériel génétique exogène dans une cellule hôte.⁷⁸ En 1987 a été introduit le terme de « lipofection » par l'équipe du Pr Felgner pour désigner la transfection avec le premier lipide cationique synthétique, nommé DOTMA (chlorure de *N*-[1-(2,3-dioléxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium) (**Figure 6**).⁷⁹ Ce n'est que peu de temps après, qu'est apparue DOGS (5-carboxyspermylglycine dioctadécylamide) (**Figure 7**), une lipopolyamine développée par l'équipe du Dr Behr.⁸⁰ Depuis, ces vecteurs lipidiques ont été utilisés dans des formulations et commercialisés comme réactifs de transfection (voir plus loin dans ce chapitre). Les lipides (poly)cationiques ayant fait l'objet de très nombreuses publications, seuls quelques exemples des composés les plus utilisés sont représentés dans les figures suivantes. Il est important de noter que les lipides (poly)cationiques sont généralement utilisés sous forme de liposomes pour la formulation de lipoplexes.

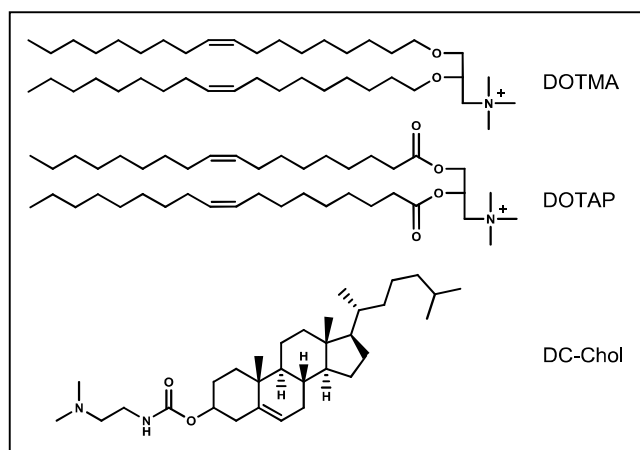


Figure 6 : Lipides monocationiques

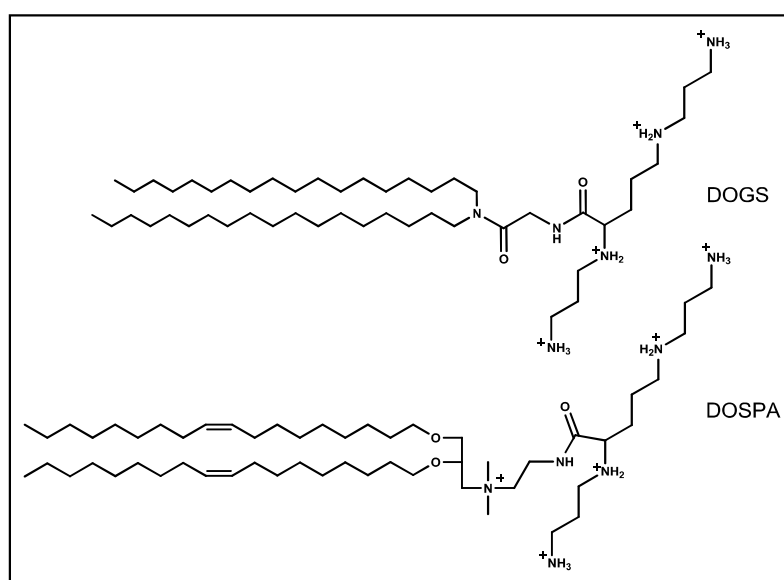


Figure 7 : Lipides polycationiques

Les lipides (poly)cationiques amphiphiles comportent typiquement trois domaines structuraux :

- une tête polaire hydrophile (poly)cationique, composée le plus souvent de fonctions amines, qui régit les interactions électrostatiques avec les phosphates des AN,
- un bras espaceur (ou « linker ») dont la taille et la nature joue sur la stabilité et la biodégradabilité du vecteur,
- une région hydrophobe, généralement à double chaîne aliphatique (saturée ou insaturée) ou de type cholestérol.

Les propriétés physico-chimiques et biologiques des lipides (poly)cationiques sont reliées à ces éléments structuraux. Il apparaît toutefois difficile de tirer des relations structure-activité puisque les travaux réalisés sont souvent difficilement comparables en raison de l'originalité des composés et de la singularité des protocoles de transfection suivis.

Tête polaire

La nature de la tête cationique et le nombre de charges qu'elle porte affectent les propriétés transfectantes des systèmes. Différents groupements peuvent être utilisés : des sels d'ammonium primaires, secondaires, tertiaires ou quaternaires, des groupements guanidinium, des hétérocycles, des acides aminés et peptides entre autres. Dans le cas des lipides monocationiques, la tête polaire est le plus souvent un sel d'ammonium quaternaire. D'autres motifs ont néanmoins été incorporés aux structures pour en améliorer les propriétés. Citons par exemple le motif pyridinium, comme dans le cas des composés SAINT (exemple du SAINT-2, **Figure 8**), qui permettrait une réduction de l'effet toxique du lipide grâce à la délocalisation de la charge.⁸¹ Outre le remplacement du groupement ammonium, sa modification peut aussi contribuer à améliorer l'efficacité de transfection. En effet, il a été montré que le potentiel d'hydratation de la tête polaire monocationique joue sur l'efficacité des systèmes. Le composé DORIE (**Figure 8**) par exemple, obtenu en substituant l'un des méthyles du DOTMA par un groupement hydroxyéthyle, a montré un meilleur niveau de transfection que son homologue non substitué.⁸² Finalement, de nombreux composés possèdent une tête polaire polycationique (**Figure 7**). L'augmentation du nombre de charges cationiques permet une plus forte interaction avec les AN⁸³ et bien souvent une efficacité de transfection supérieure.

Bras espaceur

Tous les lipides utilisés en transfection possèdent un bras espaceur de nature variable reliant la tête polaire à la partie hydrophobe. Ce dernier peut être modifié par l'introduction de diverses fonctions (amide, carbamate, ester, éther) pour améliorer notamment le trafic intracellulaire des complexes. La liaison éther par exemple confère une certaine stabilité alors que le lien ester, labile, peut être clivé plus facilement en milieu intracellulaire. Le DOTAP (**Figure 6**) par exemple est un analogue du DOTMA pour lequel les fonctions éther de l'espaceur ont été remplacées par des fonctions ester afin d'améliorer la biodégradation. D'autre part, des lipides clivables au niveau du bras espaceur ont également été créés pour favoriser le relargage de l'AN après endocytose. De telles stratégies consistent à utiliser des groupements sensibles à la lumière, au pH, au potentiel d'oxydoréduction ou à des enzymes.⁸⁴ Citons par exemple le cas des lipides cationiques réductibles possédant un pont disulfure⁸⁵ (exemple de DOGSDSO,⁸⁶ **Figure 8**) ou biodégradables tels que les composés « *charge-reversal* »⁸⁷ (**Figure 8**). Dans ces cas, la décomplexation AN/vecteur est facilitée par la présence de composés réducteurs naturels ou d'estérases dans les différents compartiments cellulaires.

Région hydrophobe

Les régions hydrophobes contribuent à l'auto-organisation des systèmes en édifices supramoléculaires. Ceci est dû à l'effet hydrophobe (minimisation des interactions avec l'eau) ainsi qu'à des considérations entropiques (libération des molécules d'eau). La région hydrophobe du lipide (poly)cationique est le plus souvent constituée d'une double chaîne apolaire ou d'un motif stéroïde. Quelques rares exemples de composés à simple chaîne existent mais ces derniers sont peu utilisés en

raison de leur plus grande toxicité liée à un effet détergent.⁸⁸ De nombreuses études ont montré que la longueur de la chaîne hydrophobe ainsi que sa nature (nombre d'insaturations, sites clivables, terminaisons fluorées...) joue un rôle important sur l'efficacité des systèmes.⁸⁹ Aussi, la présence de deux chaînes ayant des longueurs différentes dans les structures peut potentiellement améliorer l'efficacité de transfection en favorisant l'échappement endosomal.⁹⁰ Par ailleurs, les lipides (poly)cationiques perfluoroalkylés, comme l'analogue fluoré du DOGS DF4C11-GS (**Figure 8**), ont permis de formuler des lipoplexes « fluorés » présentant des propriétés originales.⁹¹⁻⁹³ Ces derniers se sont montrés plus efficaces que les lipoplexes à base de DOGS pour transfecter des cellules épithéliales pulmonaires, grâce notamment à leur plus grande stabilité dans les fluides biologiques.⁹¹ Une autre alternative consiste à utiliser des stéroïdes à la place des chaînes grasses du lipide, avec principalement le cholestérol pour modifier les propriétés des membranes. Le premier dérivé de ce type, le DC-Chol (**Figure 6**), fut développé par l'équipe du Pr Huang en 1990.⁹⁴

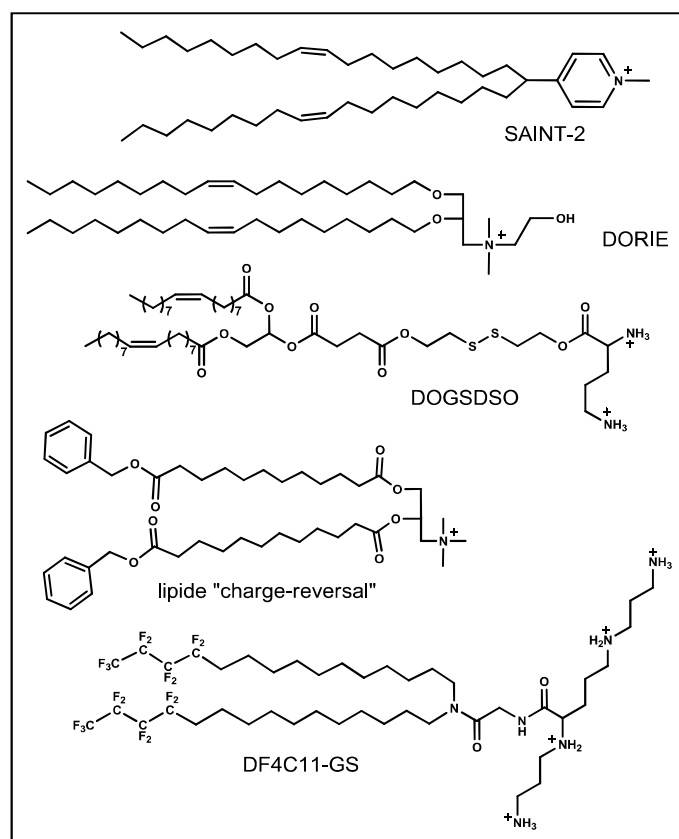


Figure 8 : Autres exemples de lipides

La morphologie et la taille des complexes obtenus à partir des lipides (poly)cationiques dépendent de nombreux critères dont la nature du lipide mais aussi du rapport N/P. Des études physico-chimiques ont mis en évidence, en fonction de ce rapport, trois zones pour lesquelles les propriétés des agrégats diffèrent.⁹⁵

Rapports N/P inférieurs à 1

Les particules ont un potentiel zêta négatif. La suspension colloïdale est stable en raison des interactions électrostatiques répulsives entre particules chargées. Le diamètre moyen des lipoplexes est faible, compris entre 100 et 200 nm. L'AN n'est pas complètement protégé et reste accessible ce qui rend les particules inutilisables *in vivo*, car les AN seraient très vite dégradés par les nucléases.

Rapports N/P voisins de 1

Les particules ont un potentiel zêta proche de l'électroneutralité et l'on constate généralement une aggrégation des complexes en agglomérats de taille micrométrique. Cela compromet une utilisation des formulations par injection systémique.

Rapports N/P supérieurs à 3

Les particules ont un potentiel zêta positif et la suspension colloïdale retrouve une certaine stabilité. Les lipoplexes ont un diamètre moyen de l'ordre de 100 à quelques centaines de nm et peuvent être utilisables par voie systémique. Les AN sont également totalement protégés d'une éventuelle dégradation enzymatique. Par ailleurs, la charge apparente positive leur permet d'interagir notamment avec des glycoprotéines membranaires négatives de type héparane sulfate, présentes à la surface de toutes les cellules, ce qui initie leur internalisation. Ces interactions purement électrostatiques favorisent certes l'endocytose des complexes, mais provoquent un problème majeur de spécificité cellulaire. Ceci se traduit par une dilution du transgène dans l'organisme et une cytotoxicité liée aux interactions non spécifiques avec de nombreux types cellulaires comme les constituants sanguins. Les interactions électrostatiques en milieu extracellulaire peuvent également entraîner un phénomène de décomplexation et libérer l'AN qui devient alors accessible aux nucléases (cf. **paragraphe IV.1**).

Les lipides (poly)cationiques sont très souvent formulés en association avec des co-lipides ou lipides « helper » tels que DOPE⁹⁶ ou le cholestérol⁹⁷ (**Figure 9**). De par leurs propriétés fusogènes, ces derniers améliorent le niveau de transfection des formulations en facilitant leur délivrance intracytoplasmique (cf. **paragraphe IV.3.1**). C'est le cas de DOTMA qui, mélangé avec DOPE au rapport massique 1/1, se retrouve sous le nom de LipofectineTM (Invitrogen). D'autre part, même si DOGS peut être utilisé sans adjonction de co-lipide, de meilleurs résultats sont obtenus avec les lipoplexes DOGS/DOPE commercialisés sous le nom de TransfectamTM (Promega). Citons enfin l'exemple DOSPA (**Figure 7**) appelé LipofectamineTM (Invitrogen) lorsqu'il est en mélange avec DOPE au rapport massique 3/1. La LipofectamineTM est d'ailleurs souvent prise comme référence lorsqu'il s'agit de tester *in vitro* de nouveaux agents de transfection.

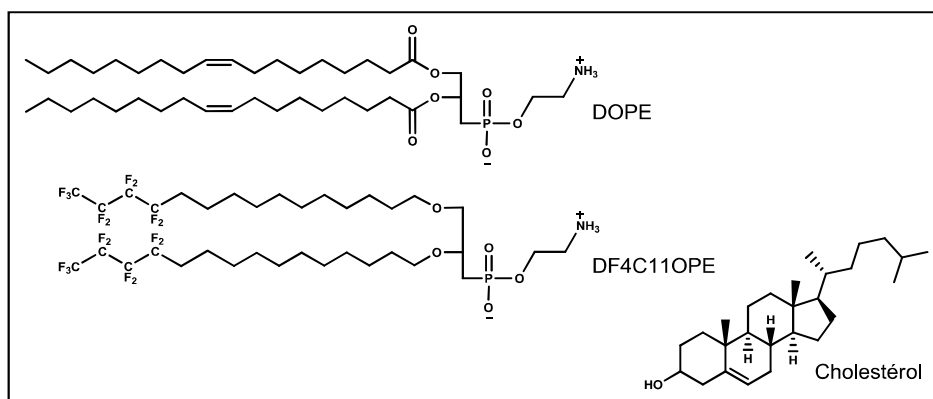


Figure 9 : Co-lipides

L'élaboration, au sein de notre laboratoire, d'analogues perfluoroalkylés de DOPE (exemple de DF4C11OPE, **Figure 9**) a conduit à une amélioration significative de son pouvoir « helper ».^{98, 99} Ceci est lié à la présence de terminaisons perfluorées plus volumineuses que les chaînes hydrocarbonées qui confère à ces analogues une géométrie conique plus prononcée. Ainsi, l'équivalent fluoré DOGS/DF4C11OPE de DOGS/DOPE (TransfectamTM) a permis de formuler des lipoplexes fluorés qui se sont révélés très efficaces dans des protocoles *in vitro* et *in vivo* de transfert de gènes. L'injection systémique de tels lipoplexes fluorés chez la souris a conduit à une expression du transgène dans les poumons plus importante (6 à 8 fois) que celle mesurée avec les lipides co-formulés avec DOPE.⁹⁸

III.2.2.2 SYSTEMES POLYMERIQUES POLYCATIONIQUES ET POLYPLEXES

Les polymères polycationiques présentent un fort potentiel pour le transfert de gènes. Ils sont notamment inspirés des histones, protéines riches en résidus basiques qui compactent efficacement l'ADN chromosomique dans les cellules eucaryotes. Le grand nombre de charges cationiques portées par ces polymères à pH physiologique, permet une condensation très efficace des AN chargés négativement par l'établissement simultané de nombreuses interactions électrostatiques. Cela génère des nanoparticules appelées polyplexes de taille généralement inférieure à celle des lipoplexes. Rappelons qu'une petite taille est cruciale pour une éventuelle application *in vivo*. Les polymères polycationiques présentent également une meilleure solubilité dans l'eau par rapport aux lipides cationiques, et sont donc plus facile à manipuler et à formuler. Ci-après seront présentés quelques uns des principaux vecteurs polymériques utilisés pour le transfert d'AN.

- Dérivés de poly-L-lysines (PLL)

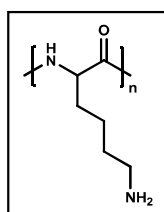


Figure 10 : Poly-L-lysine

La poly-L-lysine (PLL) est l'un des premiers polymères polycationiques à avoir été utilisé comme agent de transfection *in vitro* et *in vivo*.^{100, 101} Il s'agit d'un polypeptide linéaire dont la sous-unité est la lysine (**Figure 10**). A pH physiologique, toutes les amines primaires qui le constituent sont chargées positivement ce qui lui permet d'interagir fortement avec les AN. Aussi, la biodégradabilité intrinsèque de ce composé en fait *a priori* un bon candidat le transfert de gènes *in vivo*. Pour autant, sans modification structurale, la PLL ne présente pas de pouvoir tampon pour favoriser son échappement des vésicules d'endocytose. La transfection peut toutefois être améliorée par l'utilisation d'agents endosomolytiques tel que la chloroquine ou de peptides fusogènes, ou alors une combinaison des deux.¹⁰² Des PLL modifiés comportant des résidus histidine ou des groupements imidazole permettant un effet tampon ont aussi conduit à de meilleurs niveaux de transfection.¹⁰³ En général, seuls les PLL de hauts poids moléculaires (> 3kDa) forment des polyplexes stables du fait d'un nombre important de charges cationiques. Bien que plus aptes à condenser l'ADN et de ce fait plus efficaces, ces derniers conduisent pourtant à de forts niveaux de cytotoxicité.¹⁰⁴ Ils ont également tendance à former des complexes qui s'agrègent en condition saline physiologique, et qui se fixent aux protéines sériques entraînant une rapide élimination de la circulation sanguine. L'incorporation de polyéthylène glycol (PEG) dans les structures par exemple peut éviter la formation d'agrégats insolubles, augmenter le temps de ½ vie des complexes en milieu extracellulaire et ainsi diminuer la cytotoxicité.¹⁰⁵ Finalement, d'autres structures polypeptidiques inspirées des PLL ont été développées, citons par exemple la polyornithine et la polyarginine, moins toxiques et plus efficaces pour le transfert de gènes.¹⁰⁶

- Dérivés de polyéthylène imine (PEI)

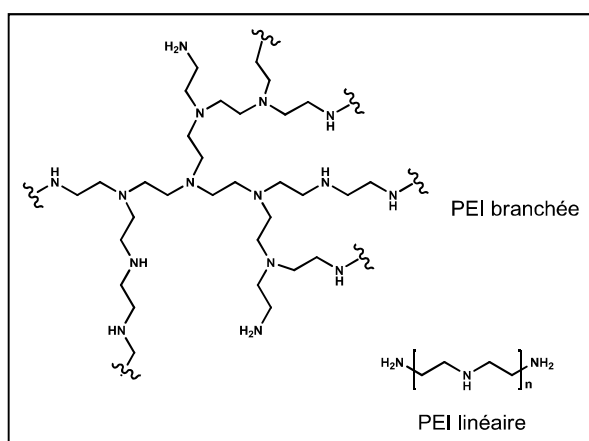


Figure 11 : Polyéthylène imine (PEI)

En 1995, les travaux de J. P. Behr et son équipe ont mis au grand jour le potentiel de la polyéthylène-imine (PEI) en tant qu'agent de transfert de gènes.¹⁰⁷ Les PEI comptent encore aujourd'hui parmi les vecteurs synthétiques de transfert d'AN les plus efficaces. L'efficacité de transfection exceptionnelle des PEI est en grande partie attribuée à leur pouvoir tampon qui facilite la rupture de l'endosome et

la sortie des polyplexes endocytés (cf. **paragraphe IV.3.1**). Le nombre important de fonctions amines et leur nature diverse (primaire, secondaire et, le cas échéant, tertiaire) confèrent en effet aux PEI un pouvoir tampon sur une large gamme de pH. Par ailleurs, comme dans le cas des PLL, l'efficacité de transfection tout comme la cytotoxicité augmente avec le poids moléculaire des PEI.¹⁰⁸ Ainsi, le poids moléculaire optimal pour la formation de polyplexes à base de PEI se situent entre 5 et 25 kDa. Par ailleurs, les PEI existent sous forme linéaire ou branchée, deux structures ayant des propriétés qui diffèrent (**Figure 11**).¹⁰⁹ Une structure linéaire est par exemple moins efficace pour condenser l'ADN par rapport à une structure branchée de même poids moléculaire.¹¹⁰ Toutefois, les PEI linéaires sont parmi les plus performants en termes d'efficacité de transfection, deux dérivés sont d'ailleurs commercialisés sous les noms de ExGen500TM et JetPEITM.¹¹¹ JetPEITM est aussi très souvent utilisé en référence quant à l'évaluation de l'efficacité de nouveaux agents de transfection. Depuis les premières applications du PEI, ce dernier a été décliné sous différentes variations dans le but d'améliorer les propriétés physicochimiques et le devenir biologique des polyplexes.¹¹² La modification la plus communément utilisée est la PEGylation qui permet de réduire l'interaction des complexes avec les constituants sanguins, et d'améliorer le profil de cytotoxicité. Pour diminuer la toxicité relativement élevée des PEI *in vivo*, d'autres études se sont orientées vers le développement de structures dites biodégradables, comportant des liaisons de type ester, disulfure ou encore carbamate.¹¹³

Comme dans le cas des lipoplexes, la capacité de transfection des polyplexes est régie par leur morphologie et leur charge de surface. Pour des rapports N/P autour de la neutralité, les complexes polymériques sont de grandes tailles, s'agrègent facilement et présentent une efficacité de transfection limitée. Pour des rapports N/P élevés (5-10), les polyplexes sont de plus petites tailles (de l'ordre de la centaine de nanomètres) et sont des agents de transfert de gènes nettement plus efficaces.

III.2.2.3 SYSTEMES BASES SUR L'AMPHIPHILIE FACIALE : EXEMPLE DES CYCLODEXTRINES¹¹⁴

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligomères cycliques d'unités α -1,4-glucoses formant un cône tronqué avec un espace interne creux (**Figure 12**). Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes sont les α -, β - et γ -CDs qui contiennent respectivement 6, 7 ou 8 résidus glucoses. Si l'enveloppe externe de ces molécules est hydrophile, elles présentent une cavité interne apolaire dans laquelle peuvent se loger de petites molécules hydrophobes pour former des complexes dits d'inclusion. Cette particularité leur vaut d'être utilisées comme agents solubilisants ou excipients pour certains médicaments. Elles peuvent aussi, dans certains cas, faciliter leur transport transmembranaire.

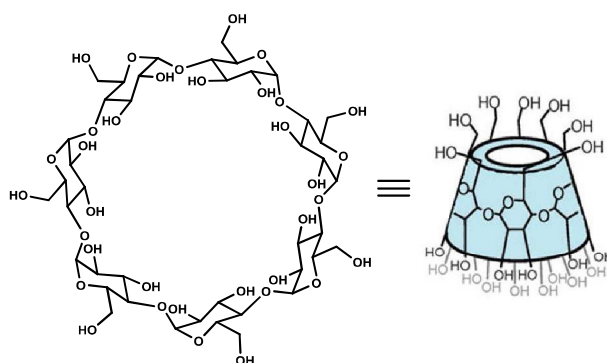


Figure 12 : Structure et représentation schématique d'une β -cyclodextrine, modifié d'après¹¹⁵

La faible immunogénicité des CDs ainsi que les propriétés liées à leur structure ont été exploitées pour le transfert de gènes. Elles ont notamment été utilisées pour l'obtention de cyclodextrines cationiques. Elles forment alors avec l'ADN des complexes stables de taille comprise entre 100 et 200 nm. Par exemple, la heptakis(6-amino-6-déoxy)- β -CD possède une efficacité de transfection en présence de sérum comparable à celle du DOTAP (**Figure 13, A**).¹¹⁶ D'autres conjugués tel que la β -CD-oligoéthylèneamine (**Figure 13, B**) présentent une efficacité de transfection proche de celle du JetPEITM, mais avec une cytotoxicité bien moindre.¹¹⁷

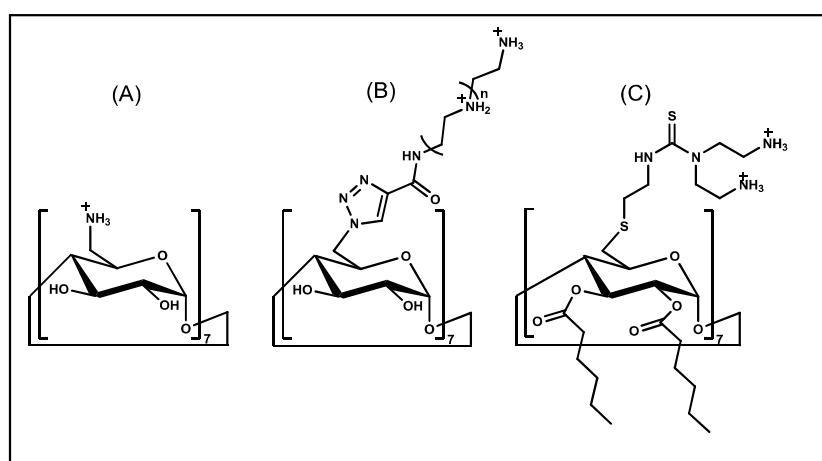


Figure 13 : Représentation de la heptakis(6-amino-6-déoxy)- β -CD (A), d'une série de CDs polycationiques (B)¹¹⁷ ainsi que d'un exemple de CD polycationique amphiphile (C)¹¹⁸

Outre l'utilisation de CDs sous leur forme moléculaire (à l'état monomère) pour compacter l'ADN, des systèmes polymériques de type « CD-polymère cationique » ont aussi été décrits. Prenons l'exemple de polymères type PEI fonctionnalisés avec des CDs. La conjugaison de β -CDs avec un PEI branché de faible poids moléculaire (600 Da) a conduit à un système d'efficacité de transfection similaire au PEI (25 kDa), pour une toxicité plus faible.¹¹⁹

Cependant, les résultats les plus significatifs ont été obtenus en collaboration avec l'équipe du Dr J. M. García Fernandez (Centro mixto CSIC-Universidad de Sevilla-Instituto de Investigaciones Químicas) et du Pr C. Ortiz Mellet (Facultad de Química, Universidad de Sevilla). Nos équipes ont montré que,

l'amphiphilie faciale résultant de la fonctionnalisation sélective au niveau de chacune de leurs faces permettait d'obtenir des CDs polycationiques amphiphiles (exemple d'une des têtes de file **Figure 13, C**). Ces dernières peuvent condenser l'ADN en une population monodisperse de particules cationiques de très petite taille (< 100 nm). Par homologie avec les lipoplexes et les polyplexes, ces particules d'ADN sont appelées CDplexes. Les CDplexes sont capables de transférer *in vitro* diverses lignées cellulaires, avec des efficacités comparables à celles obtenues avec le JetPEITM et un meilleur profil de viabilité cellulaire.^{118, 120} Finalement, les CDplexes peuvent aussi être fonctionnalisés pour le ciblage cellulaire, soit par formation de complexes d'inclusion¹²¹, soit par greffage par exemple de ligands glycosylés pour la reconnaissance spécifique de récepteurs lectines.¹²²

Ainsi, les cyclodextrines permettent non seulement de diminuer la cytotoxicité des formulations mais offrent aussi, en tant que plateforme et par leur capacité d'inclusion, des possibilités de poly-fonctionnalisation qui permettent la formulation de vecteurs fonctionnalisés aux propriétés multiples.

III.2.2.4 BILAN SUR LES VECTEURS SYNTHETIQUES

Les vecteurs synthétiques présentent des avantages importants par rapport aux vecteurs viraux. Ils sont plus simples à produire, à manipuler, et d'un moindre coût même à plus grande échelle. Leur plus faible immunogénicité ainsi que leur capacité à transporter des transgènes sans limitation de taille ont aussi largement contribué à leur développement. Ces systèmes sont cependant efficaces *in vitro* mais conduisent le plus souvent à des populations polydisperses, donc hétérogènes et ne pouvant trouver de réelles applications *in vivo*. Les études précliniques montrent en effet que les vecteurs synthétiques sont généralement moins efficaces que les virus recombinants. Ceci est aussi largement imputable au manque d'éléments servant à transgresser les différentes barrières de l'organisme, alors que les virus, eux, en sont parfaitement équipés.

Pour pallier ces limites, des vecteurs synthétiques de seconde génération ont été développés. Ces systèmes visent à améliorer une ou plusieurs des étapes limitantes liées aux barrières du transfert de gènes. Ces systèmes particuliers feront l'objet de la partie II du manuscrit.

IV. BARRIERES AU TRANSFERT DE GENES PAR LES VECTEURS NON VIRAUX¹²³

Alors que les vecteurs viraux ont évolué pour cibler et pénétrer les cellules cibles afin d'y délivrer leur matériel génétique, l'efficacité du transfert de gènes par des vecteurs synthétiques repose sur leur capacité à :

- éviter les obstacles extracellulaires,
- cibler un type cellulaire,
- traverser la membrane plasmique et/ou sortir des endosomes,
- se propager dans le cytosol jusqu'au noyau,
- franchir l'enveloppe nucléaire,
- utiliser la machinerie cellulaire pour fournir un niveau d'expression du transgène qui soit significatif.

Toutes ces étapes constituent les principales limitations des vecteurs non-viraux.

IV.1 BARRIERES EXTRACELLULAIRES : CIRCULATION DANS LES FLUIDES BIOLOGIQUES

En culture cellulaire, les protéines sériques constituent le seul obstacle rencontré par les complexes pour atteindre la surface cellulaire. Lorsque les expériences sont réalisées en présence de sérum, on observe généralement une diminution du niveau de transfection des lipoplexes ou des polyplexes.¹²⁴ L'efficacité de transfection *in vitro* augmente avec le rapport de charge et la taille des complexes (≥ 500 nm). De telles particules sédimentent à la surface des cellules adhérentes par simple gravité et interagissent avec les protéines de surface chargées négativement. Il s'en suit une internalisation plus facile qui intervient généralement par endocytose non spécifique. En revanche, ces particules ne peuvent être utilisées pour une application *in vivo* par voie systémique.

In vivo, différents modes d'administration des complexes peuvent être utilisés : l'injection par voie systémique (intraveineuse, intraartérielle), l'injection locale (intramusculaire, intratrachéale, intratumorale...) ou encore la voie orale. Toutefois, la voie systémique reste privilégiée dans de nombreux cas puisqu'elle permet d'atteindre l'ensemble du système endothélial et d'accéder aux métastases, par exemple. Dans la circulation sanguine, les complexes cationiques interagissent de façon non spécifique avec les protéines chargées négativement (albumine, fibronectine, opsonines, immunoglobulines etc...) et s'agrègent. Les grosses particules ainsi formées sont alors rapidement éliminées par les macrophages.¹²⁵ Il est à noter que plus le rapport de charge est élevé, c'est-à-dire plus la charge cationique est grande, et plus ils sont évacués rapidement. L'élimination des complexes peut aussi résulter d'interactions électrostatiques avec les cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes...). Par ailleurs, leur élimination au niveau de la voie sanguine entraîne une accumulation dans les organes filtres (poumons, foie, rate) susceptible d'induire une toxicité. Alors qu'une grande partie des complexes injectés est généralement piégée au niveau du foie (50-60%), le

transgène est majoritairement exprimé au niveau des poumons et de la rate.¹²⁶ Parallèlement, les interactions électrostatiques peuvent aussi déstabiliser les complexes et provoquer un phénomène de décomplexation. L'ADN nu se retrouve alors exposé à la dégradation par les nucléases.³⁸ Finalement, l'activation du système immunitaire par les vecteurs synthétiques est une autre barrière à souligner. Même si ce problème est bien souvent associé aux vecteurs viraux, certains systèmes non viraux sont également susceptibles d'induire une réponse.

De nombreuses stratégies ont été envisagées pour limiter les interactions avec les constituants extracellulaires mais la méthode communément utilisée consiste à formuler des lipo(poly)plexes dits « furtifs ». Initialement, cette stratégie a été mise au point pour augmenter la persistance intravasculaire de liposomes vecteurs de médicaments.¹²⁷ Ces formulations furtives ont une capacité limitée à diffuser à travers la paroi des vaisseaux sanguins, sauf au niveau des tissus cancéreux où une réaction inflammatoire induit une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ainsi, la rémanence vasculaire accrue de tels vecteurs permet une pénétration dans les tissus malades par diffusion passive. Cette accumulation sélective dans les tumeurs est appelée effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*).¹²⁸

L'élaboration de formulations furtives consiste le plus souvent à recouvrir la surface des lipoplexes et polyplexes par des chaînes de polyéthylène glycol (PEG), en général de masse moléculaire allant de 2000 à 5000 Da. Plusieurs voies sont alors envisageables, à savoir l'utilisation de polymères ou lipides (poly)cationiques greffés à des PEG, ou alors le greffage de PEG sur la surface de nanoparticules d'ADN préformées.¹²⁹ Ainsi, les complexes se voient dotés d'un bouclier stérique et hydrophile dense, qui limite les interactions non spécifiques d'ordre électrostatique ou autre. Cela prévient également l'agrégation des nanoparticules avec les constituants sanguins et augmente leur biodisponibilité. Le PEG présente aussi l'avantage d'être biocompatible et d'augmenter la solubilité des formulations. Toutefois, la longueur du PEG et le degré de PEGylation peut affecter la compaction de l'ADN et la stabilité des vecteurs en milieu sanguin.¹³⁰ Le PEG peut aussi potentiellement activer le système immunitaire, et la synthèse d'anticorps IgM anti-PEG après la première injection.¹³¹ Par ailleurs, le fait de masquer les charges cationiques des lipo(poly)plexes réduisant considérablement les interactions électrostatiques avec les cellules, les niveaux de transfection s'en trouvent diminués de façon significative.^{132, 133} La « parade » communément utilisée consiste alors à utiliser des ligands de ciblage fixés à l'extrémité des PEG pour que l'entrée dans la cellule se produise également *via* une endocytose spécifique (cf. **paragraphe IV.2**). Il a aussi été montré que les résidus PEG pouvaient compromettre la sortie endosomale des complexes.¹³⁴ Pour contourner ces limitations, les recherches se sont orientées vers l'élaboration de motifs PEG clivables de façon spécifique en conditions physiologiques (pH, enzymes spécifiques...).¹³⁵

IV.2 ENTREE DANS LA CELLULE

La membrane plasmique qui délimite le compartiment intracellulaire est constituée de lipides (phospholipides, cholestérol), de protéines et de glucides. Elle joue le rôle de barrière sélective et dynamique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, et contrôle l'homéostasie. Ainsi, elle constitue l'un des principaux obstacles à franchir pour le transgène.

Cas de l'ADN nu

L'ADN nu se lie difficilement à la membrane cellulaire à cause de répulsions électrostatiques entre espèces chargées négativement. Les méthodes physiques⁶⁴ vues précédemment pour l'introduction d'ADN nu (cf. **paragraphe III.2.1**), telles que l'électroporation ou encore la sonoporation, restent limitées d'un point de vue applications cliniques.

Cas des vecteurs cationiques de première génération (non ciblés)

Contrairement à l'ADN nu, les vecteurs synthétiques interagissent avec la membrane d'autant plus fortement qu'ils sont chargés positivement, et que celle-ci exprime des protéines anioniques. Ces interactions électrostatiques non spécifiques sont essentiellement médiées par des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs). Même si le rôle exact des protéoglycanes dans le processus de transfection n'est pas totalement élucidé, la fixation des complexes sur ces protéines membranaires pourrait être un stimulus à leur internalisation par endocytose.¹³⁶ L'inhibition de l'expression de ces protéines par action enzymatique ou métabolique a permis de prouver leur implication directe sur le niveau de transfection.¹³⁷ Toutefois, ces interactions électrostatiques non spécifiques sont un inconvénient majeur pour une application *in vivo* par voie systémique. La fixation des complexes cationiques sur toutes les cellules rencontrées conduit à une dispersion et une dilution du transgène dans l'organisme. De plus, comme évoqué précédemment, les interactions non spécifiques avec les constituants sanguins conduisent à une rapide élimination des complexes par le système immunitaire. De ce fait, l'un des objectifs majeurs de la thérapie génique est de cibler spécifiquement un type cellulaire.

Cas des vecteurs de deuxième génération (ciblés)

Dans la majorité des cas, un tel ciblage repose sur l'incorporation de ligands spécifiques dans la structure des vecteurs reconnus par des récepteurs cellulaires. La spécificité accroît théoriquement la concentration des complexes à la surface des cellules ciblées augmentant ainsi leur probabilité d'internalisation. Dans ce cas, la pénétration des complexes dans la cellule s'effectue par endocytose médiée par des récepteurs, *via* des interactions spécifiques. Cette stratégie est inspirée du concept de « magic bullet » mis en avant par Paul Ehrlich, prix Nobel de médecine en 1908, pour désigner un médicament idéal qui, après injection systémique, serait capable de cibler un type cellulaire en particulier. Le premier système développé sur ce principe a consisté à cibler des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPR) présents sur les hépatocytes grâce à des motifs ASGP greffés sur des

poly-L-lysines.¹⁰⁰ S'en sont suivis de nombreux travaux portant sur le couplage de ligands divers et variés à des vecteurs de type lipidique ou polymérique puis leur évaluation *in vitro* et *in vivo*.¹³⁸ Il existe deux stratégies principales qui visent à conjuguer le ligand soit directement à la surface des complexes cationiques, soit à l'extrémité du polymère hydrophile (généralement un PEG) porté par des complexes furtifs. Les stratégies de ciblage impliquent par exemple les récepteurs folates,¹³⁹ lectines,¹⁴⁰ transferrines,¹⁴¹ intégrines,¹⁴² antigéniques,¹⁴³ des facteurs de croissance¹⁴⁴ ou à chimiokines.¹⁴⁵ La majorité des recherches dans ce domaine sont consacrées à la conception de vecteurs ciblant les cellules cancéreuses, car elles surexpriment certains de ces récepteurs membranaires. Ainsi, le récepteur folate et celui de la transferrine sont surexprimés par de nombreuses cellules tumorales et constituent des cibles de choix pour le développement de thérapies géniques anticancéreuses. Par exemple, des polyplexes de type PEI-PEG-folate vectorisant des gènes suicides et/ou apoptotiques ont été injectés par voie intracrânienne sur des souris porteuses de gliomes. Les résultats obtenus montrent une régression de la taille des tumeurs et un allongement de la survie des sujets.¹⁴⁶ Par ailleurs, l'efficacité antitumorale de lipoplexes conjugués à la transferrine a été évaluée dans le cadre de stratégies par gène suicide. L'injection intratumorale de ces formulations a permis de favoriser l'apoptose des cellules tumorales, et d'augmenter le taux de lymphocytes T et de cytokines.¹⁴⁷ Plus récemment, une étude portant sur le développement de nanovecteurs fonctionnalisés par deux ligands de ciblage, de type PEI-PEG-folate et PEI-PEG-transferrine, a été publiée. L'efficacité de transfection *in vivo* des formulations a été évaluée sur des modèles animaux porteurs de tumeurs, et de meilleurs résultats ont été obtenus avec les nanoparticules portant les deux ligands, par rapport à celles mono-fonctionnalisées.¹⁴⁸

Aujourd'hui, il a été prouvé que l'endocytose constitue le mécanisme principal d'internalisation des vecteurs non viraux.¹⁴⁹ Cependant, une alternative est la fusion membranaire qui implique le mélange entre les constituants des complexes et de la membrane cellulaire. L'internalisation des complexes par un phénomène de fusion requiert la présence d'éléments fusogènes (lipides et/ou peptides) dans la formulation, et reste un événement mineur. Ainsi, des liposomes fusogènes issus d'une fusion avec le virus Sendaï préalablement inactivé sont communément utilisés pour délivrer des nanoparticules dans le cytoplasme.¹⁵⁰ Un autre exemple repose sur l'incorporation de peptides fusogènes provenant de la glycoprotéine H du virus de l'herpès simplex dans des liposomes cationiques afin d'améliorer l'internalisation et l'échappement endosomal de complexes liposome-ADN.¹⁵¹

Finalement, les peptides pénétrants (*Cell Penetrating Peptides*, CPPs)¹⁵² peuvent aussi être utilisés pour faciliter l'internalisation des complexes. Les CPPs sont de petits peptides (entre 12 et 16 résidus) très chargés et riches en acides aminés basiques, capables de franchir la membrane plasmique de nombreux types cellulaires. Ils peuvent être dérivés de protéines telles que Tat (*Trans-Activator of Transcription*, VIH-1)¹⁵³ et Penetratin (*Antennapedia*, *Drosophila Melanogaster*).¹⁵⁴ Dans

ce cas, les séquences peptidiques minimales responsables de l'internalisation sont appelées domaines de transduction des protéines (*Protein Transduction Domains*, PTDs). Les CPPs incluent aussi des peptides chimériques comme transportan,¹⁵⁵ ou synthétiques comme ceux issus de la famille des polyarginines.¹⁵⁶ Outre leur association directe avec l'ADN,¹⁵⁷ les CPPs peuvent être conjugués à des lipo(poly)plexes soit par co-formulation, soit par liaison covalente. Une augmentation de l'efficacité de transfection *in vitro* de telles formulations a été observée comparativement aux complexes non-conjugués.¹⁵⁸ A ce jour, il n'existe aucun consensus quant au mécanisme d'entrée des CPPs dans le cytosol. Plusieurs mécanismes d'internalisation peuvent être envisagés suivant la nature du peptide pénétrant, à savoir translocation directe de la bicouche lipidique ou endocytose.¹⁵⁹

IV.3 TRAFIC INTRACELLULAIRE

IV.3.1 SORTIE DES ENDOSOMES¹⁶⁰

Comme souligné précédemment, l'internalisation des lipo(poly)plexes dans la cellule s'opère essentiellement par endocytose. Deux principaux types d'endocytose peuvent être distingués, à savoir la phagocytose, plutôt réservée à des cellules spécialisées (ex : macrophages, monocytes, neutrophiles), et la pinocytose, impliquée dans toutes les cellules. Au sein de la pinocytose, on dénombre trois grands mécanismes qui sont la voie clathrine, la voie cavéoline et la macropinocytose (**Figure 14**).¹⁴⁹ D'autres voies d'endocytose indépendantes de la clathrine et de la cavéoline existent, mais peu d'études font état de leur implication dans le transfert de gènes.

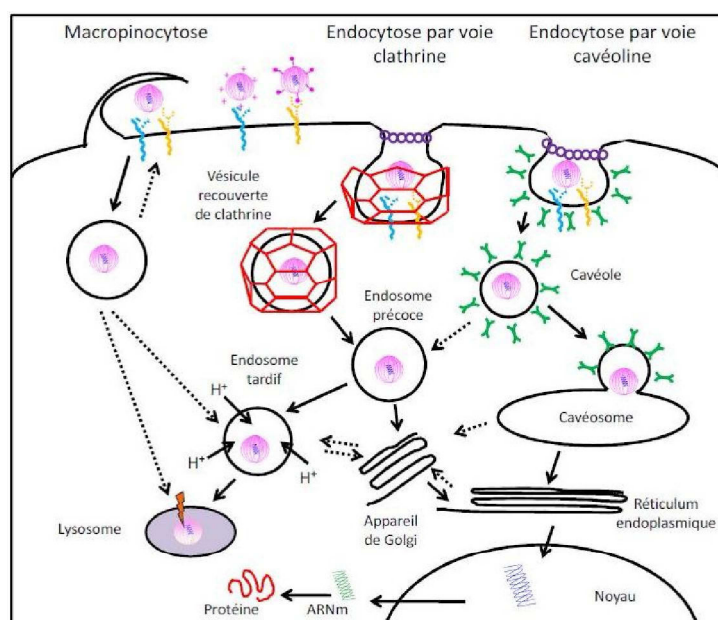


Figure 14 : Principales voies d'internalisation dans les cellules de mammifères, modifié d'après¹⁶¹

La voie clathrine-dépendante est une voie majeure d'internalisation mais aussi le mécanisme d'entrée le mieux caractérisé. Elle contrôle l'entrée sélective dans la cellule de nombreux facteurs de croissance, nutriments, pathogènes et de récepteurs comme la transferrine. Le mécanisme est déclenché par la reconnaissance spécifique de récepteurs cellulaires et par la formation de complexes ligand/récepteur. La vésicule d'endocytose se forme ensuite par invagination de la membrane plasmique recouverte par un réseau de protéines, les clathrines. La scission de la vésicule de la membrane plasmique est suivie par la perte du revêtement de clathrines. On observe alors la fusion des vésicules et la formation des premiers endosomes dits « précoces ». Les endosomes migrent ensuite lentement vers le centre de la cellule et évoluent en endosomes dits « tardifs » après acidification du milieu par action de pompes à protons ATPases dépendantes. Les endosomes tardifs fusionnent avec des lysosomes, vésicules dans lesquelles le pH est proche de 5 et qui renferment des hydrolases servant à la digestion des molécules absorbées.

Ainsi, les complexes d'AN endocytés par cette voie doivent échapper à la dégradation endo-lysosomale en sortant des compartiments endocytiques avant la fusion avec les lysosomes. La sortie des endosomes constitue l'une des principales barrières au transfert de gène des vecteurs non viraux, avec un impact non négligeable sur l'efficacité des systèmes. En effet, même si une forte internalisation des complexes est souvent observée, seule une infime fraction parvient à gagner le cytosol, la majeure partie étant piégée au niveau endosomal.¹⁶²

Afin de favoriser l'échappement des endosomes des polyplexes et des lipoplexes, différentes stratégies ont été envisagées incluant des mécanismes respectifs dits d'« éponge à protons », et l'utilisation de composants fusogènes.

IV.3.1.1 MECANISME D' « EPONGE A PROTONS » : CAS DES POLYPLEXES¹⁶³

Ce mécanisme conduit à une rupture de la vésicule par une pression osmotique accrue lors de l'acidification de l'endosome. Il ne peut avoir lieu que si les composants des complexes sont dotés de fonctions ionisables qui permettent de tamponner le milieu endosomal ($\text{pH} \approx 7 \rightarrow 5$). L'effet tampon se traduit par une entrée massive de protons dans le compartiment endosomal tandis que le polymère s'oppose à l'acidification croissante par effet tampon. L'augmentation de la concentration ionique (entrée de protons associée à un flux d'ions chlorures) s'accompagne d'une entrée conséquente d'eau par simple effet osmotique qui induit un gonflement de l'endosome et, *in fine*, son éclatement (**Figure 15**).

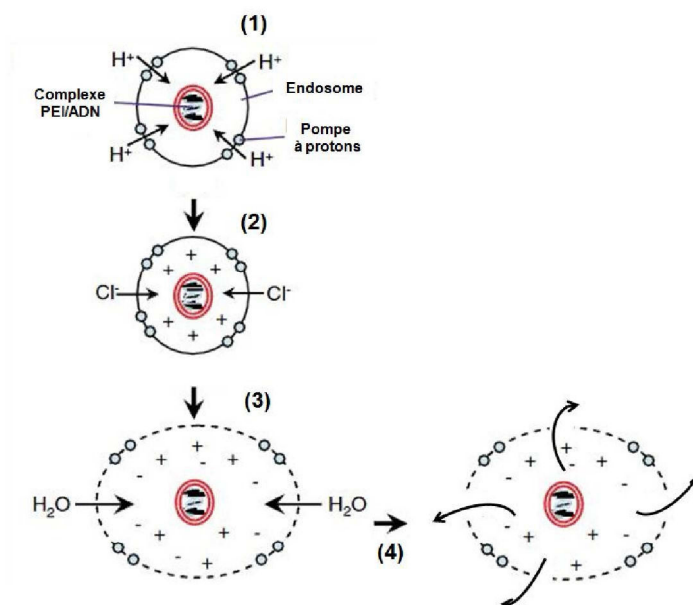


Figure 15 : Modélisation de l'échappement des endosomes par effet pompe à protons, modifié d'après¹⁶⁴

Les complexes empruntant ce mécanisme évitent la séquestration prolongée et la dégradation lysosomale. Les polymères cationiques tels que le PEI y participent activement.¹⁰⁷ Ils possèdent un pouvoir tampon élevé dans l'intervalle de pH endosomal lié à la présence d'amines protonables, et passent de 20 à 45% de protonation entre les pH 7 et 5 respectivement. A l'inverse, ce mécanisme est inopérant pour les PLL dotées d'amines primaires fortement chargées à pH physiologiques ($pK_a \approx 9-10$). L'introduction de groupements histidines ($pK_a \approx 6$) sur les structures de PLL a permis une amélioration de l'expression du transgène.¹⁶⁵ Depuis, de nombreux composés dotés de résidus histidine ou de groupements imidazole ont été synthétisés. Citons l'exemple d'un PEI branché portant des groupements imidazole qui a conduit à un meilleur niveau de transfection *in vitro* par rapport au PEI branché nu, tout en diminuant sa cytotoxicité.¹⁰³

IV.3.1.2 MECANISME « FLIP-FLOP » ET DESTABILISATION DE LA MEMBRANE ENDOSOMALE

D'après le mécanisme proposé par Zelphati et Szoka, l'échappement endosomal dans le cas des lipoplexes serait provoqué par un mécanisme de « flip-flop » des lipides anioniques de la membrane endosomale.¹⁶⁶ Une inversion des lipides anioniques, principalement situés sur la paroi cytoplasmique, serait suivie de la formation de paires d'ions avec les lipides cationiques des complexes. Cette interaction conduirait à la déstabilisation des lipoplexes et à la libération de l'ADN dans le cytoplasme (**Figure 16**).

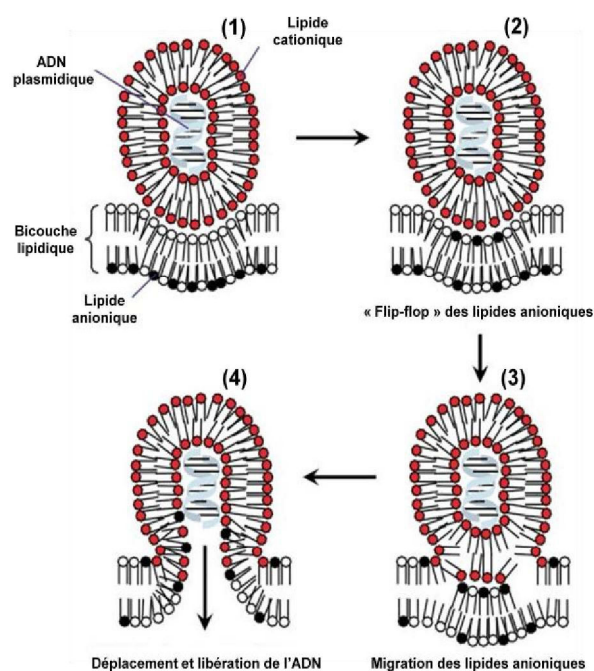


Figure 16 : Mécanisme « flip-flop » proposé, modifié d'après¹⁶⁴

La déstabilisation de la membrane endosomale peut aussi être initiée par la présence d'éléments fusogènes dans la structure du vecteur. Comme évoqué précédemment, l'utilisation conjointe de co-lipides tel que DOPE avec les lipides (poly)cationiques améliore souvent très nettement le niveau de transfection des lipoplexes. Le pouvoir fusogène de ce composé appelé lipide « helper » est lié à des changements morphologiques. A pH neutre et acide, DOPE passe d'une géométrie cylindrique à conique. La transition de phase lamellaire à phase hexagonale inverse (**Figure 17**) provoquée par l'acidification va entraîner des perturbations au point de contact entre lipoplexes et membrane endosomale, provoquant sa rupture.¹⁶⁷ Les lipospermines (DOGS, DOSPA, etc...) forment naturellement avec l'ADN des complexes de structures hexagonales, induisant tout comme DOPE une déstabilisation de la membrane endosomale.¹⁶⁸ Toutefois, ce mécanisme n'est pas produit par tous les lipides neutres, DOPC par exemple ne présente pas les mêmes propriétés fusogènes.⁹⁶

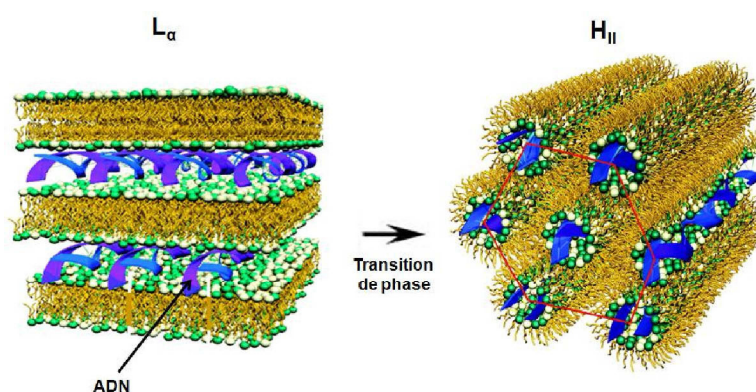


Figure 17 : Transition de phase lamellaire (L_{α}) vers phase hexagonale (H_{II}) d'un système ADN/lipide, modifié d'après¹⁶⁹

Outre l'utilisation de lipides « helper », des peptides fusogènes d'origine virale ou synthétique peuvent également favoriser l'échappement endosomal des lipoplexes ainsi que des polyplexes. De nombreux virus internalisés par endocytose utilisent en effet des protéines dites fusogènes pour sortir de l'endosome. Par exemple, la sous-unité hémagglutinine HA2 du virus influenza change de conformation en réponse au pH acide du compartiment endosomal. Cela entraîne la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale et le relargage du matériel viral dans le cytosol. L'introduction de HA2 dans la structure de polyplexes de type transferrine-PLL a permis une augmentation de leur efficacité de transfection.¹⁷⁰ Finalement, les peptides fusogènes synthétiques GALA¹⁷¹ et KALA,¹⁷² qui miment les séquences des protéines virales de fusion, sont couramment utilisés pour faciliter l'échappement endosomal des complexes.

Les vecteurs qui empruntent d'autres voies d'endocytose comme la voie cavéoline et la macropinocytose, évitent potentiellement cette étape de sortie des endosomes.¹⁷³ Toutefois, ces mécanismes sont peu élucidés et le devenir des vésicules issues de ces voies est beaucoup plus obscur.

IV.3.2 ROUTAGE INTRACELLULAIRE JUSQU'AU NOYAU

A l'exception des ARN interférents qui ont une cible cytoplasmique, l'ADN une fois relargué dans le cytoplasme doit encore atteindre le noyau de la cellule pour être exprimé. Le trafic cytoplasmique représente une autre étape limitante au transfert de gènes par les vecteurs non viraux.

IV.3.2.1 DECOMPLEXATION

La dissociation du gène thérapeutique de son vecteur doit de préférence avoir lieu une fois le site d'action atteint. Une décomplexation trop rapide expose l'ADN libre à l'action des nucléases cytosoliques, et une décomplexation tardive peut nuire à son expression. Ainsi, il apparaît primordial de connaître l'état complexé ou non de l'ADN en sortie des vésicules. Diverses études de microinjections intracytoplasmiques et intranucléaires ont permis de mettre en avant un comportement différent entre système lipidique et polymérique. *A priori*, les lipoplexes se dissocient partiellement ou totalement avant l'entrée dans le noyau pour qu'une expression du transgène puisse avoir lieu.^{174, 175} A l'inverse, les résultats montrent que les vecteurs polymériques de type PLL ou PEI facilitent l'import nucléaire de l'ADN, et n'altèrent pas son expression.^{175, 176} Des complexes PEI/ADN ont effectivement pu être observés à l'intérieur du noyau par microscopie confocale avec marquage fluorescent.¹⁷⁷ Ainsi, l'ADN serait davantage exposé à la dégradation par les nucléases cytosoliques dans le cas de systèmes lipidiques. La décomplexation est un paramètre important qu'il est possible d'améliorer en utilisant par exemple des vecteurs réductibles. L'introduction de ponts disulfure dans les structures des lipides ou des polymères à l'origine des complexes a permis une

amélioration des propriétés transfectantes des formulations. Dans ce cas, la réduction intracellulaire des ponts disulfure par des réducteurs tels que le glutathion favorise la décomplexation.^{86, 178}

IV.3.2.2 TRANSPORT CYTOSOLIQUE

Outre la présence des nucléases, le cytoplasme lui-même freine considérablement la progression de l'ADN jusqu'au noyau. C'est un milieu extrêmement visqueux riche en macromolécules du cytosquelette et en organites cellulaires. Sa concentration en protéine est estimée à 100 mg/mL. La vitesse de diffusion, dans le cytoplasme, de macromolécules comme l'ADN est inversement proportionnelle à leur taille. Des expériences de microinjection d'ADN nu ont effectivement montré qu'à partir de 2000 paires de bases (pb), l'ADN reste localisé au niveau du site d'injection.¹⁷⁹ Ainsi, si l'ADN est relargué dans le cytoplasme à distance du noyau, celui-ci ne sera pas en mesure de diffuser passivement pour l'atteindre.

Le transport cytosolique de l'ADN est un mécanisme peu connu. D'après certaines études, l'ADN utiliserait le réseau de microtubules *via* le moteur moléculaire qu'est la dynéine pour ce mouvoir jusqu'au noyau.¹⁸⁰ La vitesse du transport pourrait alors être améliorée en additionnant des sites d'interactions spécifiques sur le plasmide comme CREB¹⁸¹, ou en induisant l'acétylation des microtubules.¹⁸² Dans certains cas, les complexes eux-mêmes utiliseraient le réseau du cytosquelette pour se mouvoir à l'intérieur du cytoplasme, se comportant ainsi comme certains virus. Les virus ont effectivement développé plusieurs stratégies pour contourner les barrières intracellulaires. Les filaments d'actine et les microtubules du cytosquelette, associés aux protéines cargo (dynéine ou kinésine), constituent la base structurale de leurs déplacements dans la cellule infectée.^{183, 184} Suh et al ont montré un transport actif de complexes PEI/ADN vers la région périnucléaire grâce aux microtubules et aux moteurs protéiques associés.¹⁸⁵ Peu après, une autre étude a suggéré le transport cytoplasmique de l'endosome renfermant le complexe PEI/ADN plutôt qu'une interaction directe entre PEI et microtubules.¹⁸⁶ L'acétylation des microtubules peut aussi dans le cas des polyplexes potentiellement améliorer le niveau d'expression du transgène en facilitant le recrutement de protéines cargo.¹⁸⁷ Le réseau de microtubules a également une grande importance pour ce qui est du déplacement cytosolique des systèmes lipidiques.¹⁸⁸ Le routage intracellulaire des vecteurs non-viraux étant le point central de l'étude menée durant cette thèse, il sera décrit en détail dans la partie II du manuscrit.

IV.3.3 TRANSPORT NUCLEAIRE

Pour pouvoir utiliser la machinerie cellulaire nécessaire à son expression, le gène thérapeutique doit être en mesure de pénétrer l'enveloppe nucléaire. Suivant la quantité d'ADN complexé, la transfection par des systèmes lipidiques ou polymériques permettrait de délivrer 2000 à 100 000 copies d'ADN à l'intérieur de chaque cellule.¹⁸⁹ On estime toutefois que seul 1 à 10% de l'ADN délivré serait effectivement retrouvé dans le noyau puis transcrit.¹⁹⁰ L'enveloppe nucléaire représente donc

une autre barrière significative, qui freine l'entrée des complexes ou de l'ADN libre dans le noyau. La transfection non virale est dépendante du cycle cellulaire. Elle est relativement plus efficace dans les cellules en division que dans les cellules quiescentes. L'ADN pénétrerait dans le noyau préférentiellement pendant la mitose, au moment de la rupture temporaire de la membrane nucléaire.¹⁹¹ Néanmoins, la transfection de cellules neuronales (quiescentes) avec des polyplexes de type PEI montre que d'autres mécanismes sont *a priori* impliqués dans le processus de migration intranucléaire.¹⁹²

Lorsque l'enveloppe du noyau reste présente (cas des cellules quiescentes), les systèmes doivent passer à travers les petits pores de la membrane nucléaire. Les pores nucléaires sont des complexes multiprotéiques ancrés dans l'enveloppe nucléaire, connus sous le nom de complexes du pore nucléaire (*Nuclear Pore Complexes*, NPCs).¹⁹³ Ils permettent un transport bidirectionnel sélectif entre cytoplasme et nucléoplasme. Les molécules dont la masse moléculaire n'excède pas 45 kDa peuvent traverser les pores nucléaires par diffusion passive. Au-delà, elles peuvent bénéficier d'un transport actif *via* des récepteurs de transport nucléaire. Elles doivent dans ce cas présenter des séquences spécifiques de localisation nucléaire (*Nuclear Localization Signal*, NLS) ou d'exportation nucléaire (*Nuclear Export Signal*, NES). Les protéines nucléaires ainsi que de nombreux virus sont dotés de séquences NLS, qui sont de courts motifs (4 à 8 acides aminés) invariablement riches en acides aminés basiques tels que la lysine ou l'arginine. La première séquence de ce type, à savoir PKKKRKV, fut identifiée sur l'antigène *large T* (Tag) du virus simien 40 ou SV40.¹⁹⁴

De nombreuses stratégies ont été envisagées pour améliorer la pénétration du transgène dans le noyau. Une majorité d'entre elles repose sur l'incorporation de peptides portant une séquence NLS dans les formulations vectorisantes pour faciliter le recrutement de la machinerie d'import nucléaire. Les séquences NLS peuvent être associées aux vecteurs d'ADN *via* des interactions électrostatiques, ou alors de façon covalente.¹⁹⁵ La première approche repose sur les interactions entre les charges anioniques de l'ADN et les charges cationiques portées par les aminoacides des peptides NLS (par exemple la séquence TAG^{196, 197}). La séquence NLS a aussi été couplée de façon covalente à la polylysine, elle-même utilisée pour complexer l'ADN.¹⁹⁸ Dernièrement, Matschke et al ont montré un transfert de gènes efficace *in vitro* et *in vivo* en complexant l'ADN avec des peptides NLS dimériques seuls ou en combinaison avec du PEI.¹⁹⁹ Pour prévenir la dissociation entre ADN et peptide NLS au cours du trafic intracellulaire, une autre stratégie vise à utiliser des liens covalents plutôt que des interactions purement électrostatiques. Des résultats très encourageants ont été obtenus par l'équipe du Dr Behr, dont les travaux reposent sur le couplage covalent d'un fragment d'ADN linéaire (4000 pb) à un seul peptide NLS.²⁰⁰ A l'inverse, l'association aléatoire de plusieurs séquences NLS à l'ADN n'a pas conduit à des résultats aussi satisfaisants.²⁰¹ Plus récemment, le couplage d'un peptide NLS à un fragment d'ADN linéaire n'a pas permis d'améliorer l'efficacité de transfection de polyplexes, ni l'import nucléaire de l'ADN.²⁰² Ainsi, le succès de ces stratégies est variable et les résultats très contrastés. Par ailleurs, le couplage covalent d'une séquence NLS à l'ADN peut

potentiellement interférer avec l'expression du transgène, et l'utilisation de NLS exogènes peut déclencher une réponse immunitaire.

Pour contourner ces limitations, une autre stratégie a émergé consistant à modifier la séquence de l'ADN plasmidique directement. Il y a une vingtaine d'années, Dean et al ont montré que l'import nucléaire des plasmides *via* les NPCs faisait intervenir une région spécifique de l'ADN SV40.²⁰³ Ainsi, quelques 72 paires de bases isolées du promoteur SV40 insérées sur un plasmide suffisent à provoquer un transport actif *via* la machinerie d'import nucléaire.²⁰⁴ Cette séquence, appelée DTS (*DNA Nuclear Targeting Sequence*), va permettre le recrutement de facteurs de transcription qui comportent leurs propres signaux de localisation nucléaire. Le plasmide se voit ainsi doté d'une ou de plusieurs séquences NLS endogènes pouvant médier son transit vers l'intérieur du noyau. Cette séquence DTS a prouvé son efficacité sur tous les types cellulaires testés, ayant une origine animale ou humaine.¹⁹⁵ Depuis, les recherches se sont tournées vers l'identification d'autres séquences DTS ayant une spécificité pour un type cellulaire donné.^{205, 206} Toutefois, il est des cas où l'utilisation de ces séquences n'a pas conduit à des résultats bénéfiques sur l'expression des gènes.²⁰⁷

IV.3.4 EXPRESSION DU TRANSGÈNE

Le transfert de gènes thérapeutiques repose habituellement sur l'utilisation d'ADN doubles brins appelés plasmides (**Figure 18**). Ces derniers sont généralement composés :

- d'une cassette d'expression du gène d'intérêt contenant le(s) transgène(s) ainsi que les séquences régulatrices permettant l'expression (promoteur, *enhancer*, « signal du poly-A », codon stop)
- d'un « backbone » bactérien permettant l'amplification du plasmide par des souches bactériennes, contenant une origine de répllication bactérienne et un gène de résistance à un antibiotique.

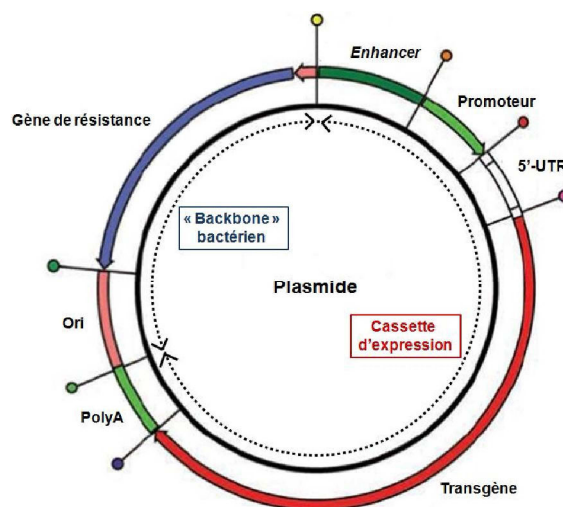


Figure 18 : Différentes composantes d'un plasmide « classique », modifié d'après²⁰⁸

Les deux dernières étapes du transfert de gènes consistent à transcrire l'ADN plasmidique en ARN messager puis à le traduire en protéine sous le contrôle de la machinerie cellulaire. La séquence nucléique transférée par les vecteurs non viraux a aussi une importance toute particulière qui a longtemps été négligée. L'optimisation de plasmides, domaine qui relève davantage des compétences de biologistes/biochimistes que de chimistes, contribue en effet à améliorer l'efficacité du transfert de gènes. Nous donnerons ici quelques exemples. Comme nous venons de le voir, des séquences spécifiques d'acides nucléiques peuvent favoriser l'import nucléaire de plasmides. Mais c'est sans doute sur le niveau et la durée d'expression du transgène que la construction du plasmide est la plus déterminante. L'expression du transgène est notamment placée sous le contrôle d'une séquence promotrice, zone sur laquelle se fixe initialement l'ARN polymérase avant de démarrer la synthèse de l'ARNm. La sélection du promoteur est donc une étape cruciale et de nombreuses stratégies d'optimisation ont été envisagées en ce sens. Par exemple, l'utilisation de promoteurs viraux a largement été étudiée *ex vivo* et *in vivo* pour augmenter le niveau d'expression du transgène.²⁰⁸ Toutefois, avec certains promoteurs comme celui du cytomegalovirus (*Immediate Early Promoter*, (IEP)-CMV), l'expression du transgène est rapidement perdue après avoir atteint un pic d'expression un à deux jours après la transfection.^{209, 210} Une autre stratégie plus actuelle consiste à insérer dans les constructions plasmidiques des promoteurs tissu- ou tumeurs-spécifiques. Ainsi, des séquences promotrices reconnues par des facteurs de transcription spécifiques ont été développées pour permettre une expression localisée de la protéine dans les tissus cibles.⁴⁶ Finalement, soulignons que les systèmes plasmidiques dits « intégratifs » ont aussi été très étudiés.²¹¹ Parmi eux se trouvent les transposons tels que *Sleeping Beauty* et *piggyBAC*, qui permettent l'excision du transgène du plasmide et sa transposition dans l'ADN cible par la méthode dite du « copier-coller ».²¹²⁻²¹⁴ Cette stratégie permet de transférer des inserts plus grands qu'avec les vecteurs viraux, de taille supérieure à 10 kb, tout en minimisant les risques liés à la présence de protéines virales.

V. CONCLUSION : VERS LA FORMULATION DE VIRUS SYNTHETIQUES

Il y a une quarantaine d'années, la thérapie génique s'est inscrite parmi les thérapies innovantes les plus prometteuses. Alors que l'enjeu initial de cette stratégie ne concernait que le traitement de maladies monogéniques, les champs d'applications sont aujourd'hui plus vastes en ciblant principalement le cancer, fléau de nos sociétés. La viabilité du concept n'est plus à prouver, en témoigne Glybera, la première thérapie génique ayant franchi le stade des essais cliniques pour être approuvée en Europe en 2012. Elle utilise un vecteur AAV pour soigner un déficit en lipoprotéine lipase responsable de pancréatites aiguës. Par ailleurs, les échecs et les succès de la thérapie génique ont largement contribué à faire évoluer les outils de vectorisation, en permettant l'identification des étapes limitantes du transfert de gènes. Même si les vecteurs viraux sont par nature efficaces pour le transfert de matériel génétique exogène, leur caractère immunogène, principalement lié aux protéines de capsid, a considérablement entravé leur essor. Les inconvénients liés à leur utilisation

ont motivé les chimistes à entreprendre le développement de vecteurs non viraux, basés sur l'assemblage supramoléculaire d'éléments synthétiques avec l'ADN. Plus particulièrement, la recherche se concentre aujourd'hui sur l'élaboration de systèmes multifonctionnels, ou « virus artificiels », qui miment les virus naturels et dont chacune des fonctions permettrait de contourner l'une ou l'autre des barrières biologiques. Ces vecteurs de demain devront être aussi efficaces que les virus sans leur caractère toxique. Concrètement, les « virus artificiels » sont idéalement des nanoparticules de petite taille (≤ 50 nm) pouvant échapper à la surveillance immunitaire, et fonctionnalisées au moyen de ligands de ciblage pour leur adressage cellulaire (**Figure 19**). Ils contiennent également des adjuvants fusogènes ou encore des composants facilitant leur trafic intracellulaire et leur localisation nucléaire. Pour autant, il n'existera jamais de vecteur universel, et comme chaque pathologie requiert un traitement particulier, il faudra une formulation qui lui soit spécifiquement adaptée.

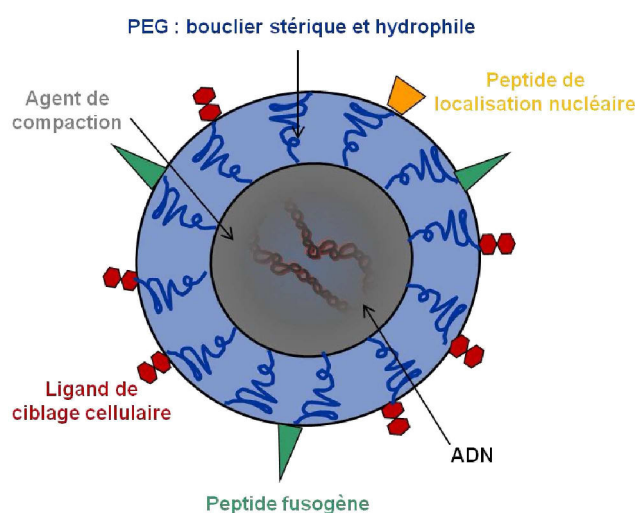


Figure 19 : Le virus artificiel, assemblage et objectifs

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aposhian, W., Human gene therapy. *Science* **1970**, 14, 987.
2. Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **1944**, 79, (2), 137-158.
3. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, 171, (4356), 737-738.
4. Ledley, F. D., Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* **1995**, 6, (9), 1129-1144.
5. Anderson, W. F., Human gene therapy. *Science* **1992**, 256, (5058), 808-813.
6. Mulligan, R. C., The basic science of gene therapy. *Science* **1993**, 260, 926-932.
7. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; LeHoczy, J.; Levine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; et al, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, 409, (6822), 860-921.
8. Cohen-Haguenaer, O., Réglementation de la thérapie génique. *Médecine/Sciences* **1999**, 15, 682-690.
9. Teichler-Zallen, D., US gene therapy in crisis. *Trends Genet* **2000**, 16, (6), 272-275.
10. Rosenberg, S. A.; Aebersold, P.; Cornetta, K.; Kasid, A.; Morgan, R. A.; Moen, R.; Karson, E. M.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Merino, M.; Culver, K.; Miller, D.; Blaese, M.; Anderson, W. F., Gene transfer into humans - Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* **1990**, 323, 570-578.
11. Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F., T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* **1995**, 270, (5235), 475-480.
12. Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey-Abina, S.; de Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J.-L.; Bouso, P.; Le Deist, F.; Fischer, A., Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **2000**, 288, 669-672.
13. Hacein-Bey-Abina, S.; Garrigue, A.; Wang, G. P.; Soulier, J.; Lim, A.; Morillon, E.; Clappier, E.; Caccavelli, L.; Delabesse, E.; Beldjord, K.; Asnafi, V.; MacIntyre, E.; Dal Cortivo, L.; Radford, I.; Brousse, N.; Sigaux, F.; Moshous, D.; Hauer, J.; Borkhardt, A.; Belohradsky, B. H.; et al, Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* **2008**, 118, (9), 3132-3142.
14. Ohana, P.; Gofrit, O.; Ayes, S.; Al-Sharef, W.; Mizrahi, A.; Birman, T.; Schneider, T.; Matouk, I.; de Groot, N.; Tavdy, E.; Sidi, A.; Hochberg, A., Regulatory sequences of H19 gene in DNA based therapy of bladder cancer. *Gene Ther Mol Biol* **2004**, 8, (181-192).
15. Maguire, A. M.; Simonelli, F.; Pierce, E. A.; Pugh, E. N.; Mingozzi, F.; Bennicelli, J.; Banfi, S.; Marshall, K. A.; Testa, F.; Surace, E. M.; Rossi, S.; Lyubarsky, A.; Arruda, V. R.; Konkle, B.; Stone, E.; Sun, J.; Jacobs, J.; Dell'Osso, L.; Hertle, R.; Ma, J. X.; et al, Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **2008**, 358, 2240-2248.
16. Bainbridge, J. W.; Smith, A. J.; Barker, S. S.; Robbie, S.; Henderson, R.; Balaggan, K.; Viswanathan, A.; Holder, G. E.; Stockman, A.; Tyler, N.; Petersen-Jones, S.; Bhattacharya, S. S.; Thrasher, A. J.; Fitzke, F. W.; Carter, B. J.; Rubin, G. S.; Moore, A. T.; Ali, R. R., Effect of gene

- therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **2008**, 358, (21), 2231-2239.
17. Cartier, N.; Hacein-Bey-Abina, S.; Bartholomae, C. C.; Veres, G.; Schmidt, M.; Kutschera, I.; Vidaud, M.; Abel, U.; Dal-Cortivo, L.; Caccavelli, L.; Mahlaoui, N.; Kiermer, V.; Mittelstaedt, D.; Bellesme, C.; Lahlou, N.; Lefrere, F.; Blanche, S.; Audit, M.; Payen, E.; Leboulch, P.; et al, Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* **2009**, 326, 818-823.
 18. Miller, N., Glybera and the future of gene therapy in the European Union. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, 11, (5), 419-419.
 19. Palfi, S.; Gurruchaga, J. M.; Ralph, G. S.; Lepetit, H.; Lavis, S.; Buttery, P. C.; Watts, C.; Miskin, J.; Kelleher, M.; Deeley, S.; Iwamuro, H.; Lefaucheur, J. P.; Thiriez, C.; Fenelon, G.; Lucas, C.; Brugières, P.; Gabriel, I.; Abhay, K.; Drouot, X.; Tani, N.; et al, Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet* **2014**.
 20. Hacein-Bey-Abina, S.; Pai, S. Y.; Gaspar, H. B.; Armant, M.; Berry, C. C.; Blanche, S.; Bleesing, J.; Blondeau, J.; de Boer, H.; Buckland, K. F.; Caccavelli, L.; Cros, G.; De Oliveira, S.; Fernandez, K. S.; Guo, D.; Harris, C. E.; Hopkins, G.; Lehmann, L. E.; Lim, A.; London, W. B.; et al, A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *New Engl J Med* **2014**, 371, (15), 1407-1417.
 21. Alton, E. W. F. W.; Armstrong, D. K.; Ashby, D.; Bayfield, K. J.; Bilton, D.; Bloomfield, E. V.; Boyd, A. C.; Brand, J.; Buchan, R.; Calcedo, R.; Carvelli, P.; Chan, M.; Cheng, S. H.; Collie, D. D. S.; Cunningham, S.; Davidson, H. E.; Davies, G.; Davies, J. C.; Davies, L. A.; Dewar, M. H.; et al, Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* **2015**, 3, (9), 684-691.
 22. <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>, Indications addressed by gene therapy clinical trials. *J Gene Med, John Wiley and Sons* **2015**, consultation août 2015.
 23. Kaji, E. H.; Leiden, J. M., Gene and stem cell therapies. *JAMA* **2001**, 285, (5), 545-550.
 24. Griesenbach, U.; Alton, E. W. F. W., Moving forward: Cystic fibrosis gene therapy. *Hum Mol Genet* **2013**, 22, (R1), R52-R58.
 25. Braun, R.; Wang, Z.; Mack, D. L.; Childers, M. K., Gene therapy for inherited muscle diseases: Where genetics meets rehabilitation medicine. *Am J Phys Med Rehabil* **2014**, 93, (11), S97-S107.
 26. Mukherjee, S.; Thrasher, A. J., Gene therapy for PIDs: Progress, pitfalls and prospects. *Gene* **2013**, 525, (2), 174-181.
 27. Amer, M. H., Gene therapy for cancer: Present status and future perspective. *Mol Cell Ther* **2014**, 2, (27).
 28. Tao, J.; Caicun, Z., The past, present and future of immunotherapy against tumor. *Transl Lung Cancer Res* **2015**, 4, (3), 253-264.
 29. Karjoo, Z.; Chen, X.; Hatefi, A., Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, in press.
 30. Moolten, F. L., Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* **1986**, 46, (10), 5276-5281.
 31. Morris, L. G. T.; Chan, T. A., Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer* **2015**, 121, (9), 1357-1368.
 32. Vazquez, A.; Bond, E. E.; Levine, A. J.; Bond, G. L., The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, 7, (12), 979-987.
 33. Li, Y.; Li, B.; Li, C.; Li, L. J., Key points of basic theories and clinical practice in rAd-p53 (Gendicine™) gene therapy for solid malignant tumors. *Expert Opin Biol Ther* **2015**, 15, (3), 437-454.
 34. Peng, Z., Current status of gendicine in China: Recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* **2005**, 16, (9), 1016-1027.

35. Dey, R.; Pillai, B., Cell-based gene therapy against HIV. *Gene Ther* **2015**, 22, (11), 851-855.
36. Yang, L.; Wang, P., Passive immunization against HIV/AIDS by antibody gene transfer. *Viruses* **2014**, 6, (2), 428-447.
37. Houk, B. E.; Hochhaus, G.; Hughes, J. A., Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma. *AAPS PharmSci* **1999**, 1, (3), 15-20.
38. Xu, Y.; Szoka, F. C., Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **1996**, 35, (18), 5616-5623.
39. Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. L., Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **1990**, 247, (4949), 1465-1468.
40. Davis, H. L.; Demeneix, B. A.; Quantin, B.; Coulombe, J.; Whalen, R. G., Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* **1993**, 4, (6), 733-740.
41. Somia, N.; Verma, I. M., Gene therapy: Trials and tribulations. *Nat Rev Genet* **2000**, 1, (2), 91-99.
42. <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>, Vectors used in gene therapy clinical trials. *J Gene Med, John Wiley and Sons* **2015**, consultation août 2015.
43. Imazu, S.; Nakagawa, S.; Nakanishi, T.; Mizuguchi, H.; Uemura, H.; Yamada, O.; Mayumi, T., A novel nonviral vector based on vesicular stomatitis virus. *J Control Release* **2000**, 68, (2), 187-194.
44. Bakhshinejad, B.; Sadeghizadeh, M., Bacteriophages as vehicles for gene delivery into mammalian cells: Prospects and problems. *Expert Opin Drug Deliv* **2014**, 11, (10), 1561-1574.
45. Seow, Y.; Wood, M. J., Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Mol Ther* **2009**, 17, (5), 767-777.
46. van Gaal, E. V.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J.; Mastrobattista, E., Plasmid engineering for controlled and sustained gene expression for nonviral gene therapy. *Pharm Res* **2006**, 23, (6), 1053-1074.
47. Vannucci, L.; Lai, M.; Chiappesi, F.; Ceccherini-Nelli, L.; Pistello, M., Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol* **2013**, 36, (1), 1-22.
48. Yi, Y.; Jong Noh, M.; Hee Lee, K., Current advances in retroviral gene therapy. *Curr Gene Ther* **2011**, 11, (3), 218-228.
49. Cockrell, A. S.; Kafri, T., Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* **2007**, 36, (3), 184-204.
50. Cartier, N.; Aubourg, P., Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol* **2010**, 20, (4), 857-862.
51. Porter, D. L.; Levine, B. L.; Kalos, M.; Bagg, A.; June, C. H., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **2011**, 365, (8), 725-733.
52. Tebas, P.; Stein, D.; Binder-Scholl, G.; Mukherjee, R.; Brady, T.; Rebello, T.; Humeau, L.; Kalos, M.; Papasavvas, E.; Montaner, L. J.; Schullery, D.; Shaheen, F.; Brennan, A. L.; Zheng, Z.; Cotte, J.; Slepishkin, V.; Veloso, E.; Mackley, A.; Hwang, W.-T.; Aberra, F.; et al, Antiviral effects of autologous CD4 T cells genetically modified with a conditionally replicating lentiviral vector expressing long antisense to HIV. *Blood* **2013**, 121, (9), 1524-1533.
53. Kotterman, M. A.; Schaffer, D. V., Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* **2014**, 15, (7), 445-451.
54. Wu, Z.; Yang, H.; Colosi, P., Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther* **2010**, 18, (1), 80-86.
55. Monahan, P. E.; Jooss, K.; Sands, M. S., Safety of adeno-associated virus gene therapy vectors: A current evaluation. *Expert Opin Drug Saf* **2002**, 1, (1), 79-91.
56. Weinberg, M. S.; Samulski, R. J.; McCown, T. J., Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology* **2013**, 69, (0), 82-88.
57. Salmon, F.; Grosios, K.; Petry, H., Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: Focus on alipogene tiparvovec (Glybera®). *Expert Rev Clin Pharmacol* **2014**, 7, (1), 53-65.

58. Douglas, J. T., Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* **2007**, 36, (1), 71-80.
59. Wold, W. S. M.; Toth, K., Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* **2013**, 13, (6), 421-433.
60. Glorioso, J. C., Herpes simplex viral vectors: Late bloomers with big potential. *Hum Gene Ther* **2014**, 25, (2), 83-91.
61. Spruance, S. L.; Tyring, S. K.; DeGregorio, B.; Miller, C.; Beutner, K., A large-scale, placebo-controlled, dose-ranging trial of peroral valaciclovir for episodic treatment of recurrent herpes genitalis. Valaciclovir HSV Study Group. *Arch Intern Med* **1996**, 156, (15), 1729-1735.
62. Sun, M.; Zhang, G. R.; Kong, L.; Holmes, C.; Wang, X.; Zhang, W.; Goldstein, D. S.; Geller, A. I., Correction of a rat model of Parkinson's disease by coexpression of tyrosine hydroxylase and aromatic amino acid decarboxylase from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector. *Hum Gene Ther* **2003**, 14, (5), 415-424.
63. De Silva, S.; Bowers, W. J., Herpes virus amplicon vectors. *Viruses* **2009**, 1, (3), 594-624.
64. Villemeijane, J.; Mir, L. M., Physical methods of nucleic acid transfer: General concepts and applications. *Br J Pharmacol* **2009**, 157, (2), 207-219.
65. Bonamassa, B.; Hai, L.; Liu, D., Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharm Res* **2011**, 28, (4), 694-701.
66. Fabre, J. W.; Grehan, A.; Whitehorne, M.; Sawyer, G. J.; Dong, X.; Salehi, S.; Eckley, L.; Zhang, X.; Seddon, M.; Shah, A. M.; Davenport, M.; Rela, M., Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther* **2008**, 15, (6), 452-462.
67. Kamimura, K.; Kanefuji, T.; Yokoo, T.; Abe, H.; Suda, T.; Kobayashi, Y.; Zhang, G.; Aoyagi, Y.; Liu, D., Safety assessment of liver-targeted hydrodynamic gene delivery in dogs. *PLoS ONE* **2014**, 9, (9), e107203.
68. Lee, P.-W.; Peng, S.-F.; Su, C.-J.; Mi, F.-L.; Chen, H.-L.; Wei, M.-C.; Lin, H.-J.; Sung, H.-W., The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials* **2008**, 29, (6), 742-751.
69. Ahlén, G.; Holmström, F.; Gibbs, A.; Alheim, M.; Frelin, L., Long-term functional duration of immune responses to HCV NS3/4A induced by DNA vaccination. *Gene Ther* **2014**, 21, (8), 739-750.
70. Zagon, I. S.; Sassani, J. W.; Malefyt, K. J.; McLaughlin, P. J., Regulation of corneal repair by particle-mediated gene transfer of opioid growth factor receptor complementary DNA. *Arch Ophthalmol* **2006**, 124, (11), 1620-1624.
71. Mir, L. M., Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenethrapy): Past, current, and future. *Mol Biotechnol* **2009**, 43, (2), 167-176.
72. Heller, L. C.; Heller, R., Electroporation gene therapy preclinical and clinical trials for melanoma. *Curr Gene Ther* **2010**, 10, (4), 312-317.
73. Delalande, A.; Kotopoulis, S.; Postema, M.; Midoux, P.; Pichon, C., Sonoporation: Mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene* **2013**, 525, (2), 191-199.
74. Deshpande, M. C.; Prausnitz, M. R., Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfection in vitro. *J Control Release* **2007**, 118, (1), 126-135.
75. Mintzer, M. A.; Simanek, E. E., Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev* **2009**, 109, (2), 259-302.
76. Yang, J.; Liu, H.; Zhang, X., Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. *Biotechnol Adv* **2014**, 32, (4), 804-817.
77. Felgner, P. L.; Barenholz, Y.; Behr, J. P.; Cheng, S. H.; Cullis, P.; Huang, L.; Jessee, J. A.; Seymour, L.; Szoka, F.; Thierry, A. R.; Wagner, E.; Wu, G., Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* **1997**, 8, (5), 511-512.
78. Fraley, R.; Subramani, S.; Berg, P.; Papahadjopoulos, D., Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J Biol Chem* **1980**, 255, (21), 10431-10435.
79. Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M., Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, 84, (21), 7413-7417.

80. Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Perez-Mutul, J., Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, 86, (18), 6982-6986.
81. van der Woude, I.; Wagenaar, A.; Meekel, A. A.; ter Beest, M. B.; Ruiters, M. H.; Engberts, J. B.; Hoekstra, D., Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, (4), 1160-1165.
82. Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L., Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* **1994**, 269, (4), 2550-2561.
83. Braunlin, W. H.; Strick, T. J.; Record, M. T., Equilibrium dialysis studies of polyamine binding to DNA. *Biopolymers* **1982**, 21, (7), 1301-1314.
84. Zhang, X.-X.; McIntosh, T. J.; Grinstaff, M. W., Functional lipids and lipoplexes for improved gene delivery. *Biochimie* **2012**, 94, (1), 42-58.
85. Wetzter, B.; Byk, G.; Frederic, M.; Airiau, M.; Blanche, F.; Pitard, B.; Scherman, D., Reducible cationic lipids for gene transfer. *Biochem J* **2001**, 356, (Pt 3), 747-756.
86. Tang, F.; Hughes, J. A., Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, 242, (1), 141-145.
87. LaManna, C. M.; Lusic, H.; Camplo, M.; McIntosh, T. J.; Barthélémy, P.; Grinstaff, M. W., Charge-reversal lipids, peptide-based lipids, and nucleoside-based lipids for gene delivery. *Acc Chem Res* **2012**, 45, (7), 1026-1038.
88. Unciti-Broceta, A.; Holder, E.; Jones, L. J.; Stevenson, B.; Turner, A. R.; Porteous, D. J.; Boyd, A. C.; Bradley, M., Tripod-like cationic lipids as novel gene carriers. *J Med Chem* **2008**, 51, (14), 4076-4084.
89. Zhi, D.; Zhang, S.; Wang, B.; Zhao, Y.; Yang, B.; Yu, S., Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjug Chem* **2010**, 21, (4), 563-577.
90. Heyes, J. A.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R. G.; Springer, C. J., Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer. *J Med Chem* **2002**, 45, (1), 99-114.
91. Gaucheron, J.; Santaella, C.; Vierling, P., Highly fluorinated lipospermines for gene transfer: Synthesis and evaluation of their in vitro transfection efficiency. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, (1), 114-128.
92. Gaucheron, J.; Santaella, C.; Vierling, P., Transfection with fluorinated lipoplexes based on fluorinated analogues of DOTMA, DMRIE and DPPES. *Biochim Biophys Acta* **2002**, 1564, (2), 349-358.
93. Remy, J.-S.; Sirlin, C.; Vierling, P.; Behr, J.-P., Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjug Chem* **1994**, 5, (6), 647-654.
94. Gao, X.; Huang, L., A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, 179, (1), 280-285.
95. Ferrari, M. E.; Nguyen, C. M.; Zelphati, O.; Tsai, Y.; Felgner, P. L., Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Hum Gene Ther* **1998**, 9, (3), 341-351.
96. Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L., The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1995**, 1235, (2), 289-295.
97. Crook, K.; Stevenson, B. J.; Dubouchet, M.; Porteous, D. J., Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum. *Gene Ther* **1998**, 5, (1), 137-143.
98. Boussif, O.; Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Kolbe, H. V.; Vierling, P., Enhanced in vitro and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid. *J Gene Med* **2001**, 3, (2), 109-114.
99. Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Sbirrazzuoli, N.; Boussif, O.; Vierling, P., In vitro cationic lipid-mediated gene delivery with fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipids. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, (6), 949-963.

100. Wu, G. Y.; Wu, C. H., Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* **1987**, 262, (10), 4429-4432.
101. Wu, G. Y.; Wu, C. H., Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem* **1988**, 263, (29), 14621-14624.
102. Wolfert, M. A.; Seymour, L. W., Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro. *Gene Ther* **1998**, 5, (3), 409-414.
103. Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A., Chemical vectors for gene delivery: A current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol* **2009**, 157, (2), 166-178.
104. Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A.; Moghimi, S. M., Low and high molecular weight poly(L-lysine)s/poly(L-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently. *FEBS Lett* **2005**, 579, (27), 6191-6198.
105. Choi, Y. H.; Liu, F.; Kim, J.-S.; Choi, Y. K.; Jong Sang, P.; Kim, S. W., Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J Control Release* **1998**, 54, (1), 39-48.
106. Saccardo, P.; Villaverde, A.; González-Montalbán, N., Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy. *Biotechnol Adv* **2009**, 27, (4), 432-438.
107. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, (16), 7297-7301.
108. Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Kriegelstein, J.; Kissel, T., In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, 24, (7), 1121-1131.
109. Wightman, L.; Kirchels, R.; Rössler, V.; Carotta, S.; Ruzicka, R.; Kurs, M.; Wagner, E., Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* **2001**, 3, (4), 362-372.
110. Dunlap, D. D.; Maggi, A.; Soria, M. R.; Monaco, L., Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* **1997**, 25, (15), 3095-3101.
111. Ferrari, S.; Moro, E.; Pettenazzo, A.; Behr, J. P.; Zacchello, F.; Scarpa, M., ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* **1997**, 4, (10), 1100-1106.
112. Neu, M.; Fischer, D.; Kissel, T., Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* **2005**, 7, (8), 992-1009.
113. Islam, M. A.; Park, T. E.; Singh, B.; Maharjan, S.; Firdous, J.; Cho, M.-H.; Kang, S.-K.; Yun, C.-H.; Choi, Y. J.; Cho, C.-S., Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA. *J Control Release* **2014**, 193, 74-89.
114. Lai, W.-F., Cyclodextrins in non-viral gene delivery. *Biomaterials* **2014**, 35, (1), 401-411.
115. Mellet, C. O.; Fernandez, J. M. G.; Benito, J. M., Cyclodextrin-based gene delivery systems. *Chem Soc Rev* **2011**, 40, (3), 1586-1608.
116. Cryan, S.-A.; Holohan, A.; Donohue, R.; Darcy, R.; O'Driscoll, C. M., Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors. *Eur J Pharm Sci* **2004**, 21, (5), 625-633.
117. Srinivasachari, S.; Fichter, K. M.; Reineke, T. M., Polycationic β -cyclodextrin "click clusters": Monodisperse and versatile scaffolds for nucleic acid delivery. *JACS* **2008**, 130, (14), 4618-4627.
118. Díaz-Moscato, A.; Le Gourriérec, L.; Gómez-García, M.; Benito, J. M.; Balbuena, P.; Ortega-Caballero, F.; Guilloteau, N.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Defaye, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., Polycationic amphiphilic cyclodextrins for gene delivery: Synthesis and effect of structural modifications on plasmid DNA complex stability, cytotoxicity, and gene expression. *Chemistry* **2009**, 15, (46), 12871-12888.
119. Tang, G. P.; Guo, H. Y.; Alexis, F.; Wang, X.; Zeng, S.; Lim, T. M.; Ding, J.; Yang, Y. Y.; Wang, S., Low molecular weight polyethylenimines linked by β -cyclodextrin for gene transfer into the nervous system. *J Gene Med* **2006**, 8, (6), 736-744.

120. Díaz-Moscoso, A.; Balbuena, P.; Gómez-García, M.; Ortiz Mellet, C.; Benito, J. M.; Le Gourriérec, L.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Mazzaglia, A.; Micali, N.; Defaye, J.; García Fernández, J. M., Rational design of cationic cyclooligosaccharides as efficient gene delivery systems. *Chem Commun* **2008**, (17), 2001-2003.
121. Davis, M. E., The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: From concept to clinic. *Mol Pharm* **2009**, 6, (3), 659-668.
122. Díaz-Moscoso, A.; Guilloteau, N.; Bienvenu, C.; Méndez-Ardoy, A.; Jiménez Blanco, J. L.; Benito, J. M.; Le Gourriérec, L.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Defaye, J.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., Mannosyl-coated nanocomplexes from amphiphilic cyclodextrins and pDNA for site-specific gene delivery. *Biomaterials* **2011**, 32, (29), 7263-7273.
123. Wang, T.; Upponi, J. R.; Torchilin, V. P., Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies. *Int J Pharm* **2012**, 427, (1), 3-20.
124. Yang, J. P.; Huang, L., Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Ther* **1997**, 4, (9), 950-960.
125. Semple, S. C.; Chonn, A.; Cullis, P. R., Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* **1998**, 32, (1-2), 3-17.
126. Zhu, N.; Liggitt, D.; Liu, Y.; Debs, R., Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* **1993**, 261, (5118), 209-211.
127. Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGuire, J.; Conover, C. D., Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, 55, (2), 217-250.
128. Maruyama, K., Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, 63, (3), 161-169.
129. Blessing, T.; Kursu, M.; Holzhauser, R.; Kircheis, R.; Wagner, E., Different strategies for formation of PEGylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, (4), 529-537.
130. Khargharia, S.; Kizzire, K.; Ericson, M. D.; Baumhover, N. J.; Rice, K. G., PEG length and chemical linkage controls polyacridine peptide DNA polyplex pharmacokinetics, biodistribution, metabolic stability and in vivo gene expression. *J Control Release* **2013**, 170, (3), 325-333.
131. Ishida, T.; Kiwada, H., Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm* **2008**, 354, (1-2), 56-62.
132. Choi, J. H.; Choi, J. S.; Suh, H.; Park, J. S., Effect of poly(ethylene glycol) grafting on polyethylenimine as a gene transfer vector in vitro. *Bull Korean Chem Soc* **2001**, 22, (1).
133. Mishra, S.; Webster, P.; Davis, M. E., PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur J Cell Biol* **2004**, 83, (3), 97-111.
134. Song, L. Y.; Ahkong, Q. F.; Rong, Q.; Wang, Z.; Ansell, S.; Hope, M. J.; Mui, B., Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *Biochim Biophys Acta* **2002**, 1558, (1), 1-13.
135. Hatakeyama, H.; Akita, H.; Harashima, H., The polyethyleneglycol dilemma: Advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol Pharm Bull* **2013**, 36, (6), 892-899.
136. Belting, M., Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci* **2003**, 28, (3), 145-151.
137. Mislick, K. A.; Baldeschwieler, J. D., Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (22), 12349-12354.
138. Ogris, M.; Wagner, E., To be targeted: Is the magic bullet concept a viable option for synthetic nucleic acid therapeutics. *Hum Gene Ther* **2011**, 22, (7), 799-807.

139. Zhao, X. B.; Lee, R. J., Tumor-selective targeted delivery of genes and antisense oligodeoxyribonucleotides via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, 56, (8), 1193-1204.
140. Gajbhiye, V.; Gong, S., Lectin functionalized nanocarriers for gene delivery. *Biotechnol Adv* **2013**, 31, (5), 552-562.
141. Dufès, C.; Al Robaian, M.; Somani, S., Transferrin and the transferrin receptor for the targeted delivery of therapeutic agents to the brain and cancer cells. *Ther Deliv* **2013**, 4, (5), 629-640.
142. Park, J.; Singha, K.; Son, S.; Kim, J.; Namgung, R.; Yun, C. O.; Kim, W. J., A review of RGD-functionalized nonviral gene delivery vectors for cancer therapy. *Cancer Gene Ther* **2012**, 19, (11), 741-748.
143. Sanz, L.; Blanco, B.; Alvarez-Vallina, L., Antibodies and gene therapy: Teaching old 'magic bullets' new tricks. *Trends Immunol* **2004**, 25, (2), 85-91.
144. Li, J.; Li, S.; Xia, S.; Feng, J.; Zhang, X.; Hao, Y.; Chen, L.; Zhang, X., Enhanced transfection efficiency and targeted delivery of self-assembling h-R3-dendriplexes in EGFR-overexpressing tumor cells. *Oncotarget* **2015**.
145. Le Bon, B.; Van Craynest, N.; Daoudi, J. M.; Di Giorgio, C.; Domb, A. J.; Vierling, P., AMD3100 conjugates as components of targeted nonviral gene delivery systems: Synthesis and in vitro transfection efficiency of CXCR4-expressing cells. *Bioconjug Chem* **2004**, 15, (2), 413-423.
146. Liang, B.; He, M.-L.; Chan, C.-y.; Chen, Y.-c.; Li, X.-P.; Li, Y.; Zheng, D.; Lin, M. C.; Kung, H.-F.; Shuai, X.-T.; Peng, Y., The use of folate-PEG-grafted-hybranched-PEI nonviral vector for the inhibition of glioma growth in the rat. *Biomaterials* **2009**, 30, (23-24), 4014-4020.
147. Neves, S.; Faneca, H.; Bertin, S.; Konopka, K.; Duzgunes, N.; Pierrefite-Carle, V.; Simoes, S.; Pedroso de Lima, M. C., Transferrin lipoplex-mediated suicide gene therapy of oral squamous cell carcinoma in an immunocompetent murine model and mechanisms involved in the antitumoral response. *Cancer Gene Ther* **2009**, 16, (1), 91-101.
148. Jing, F.; Li, D.; Xu, W.; Liu, Y.; Wang, K.; Sui, Z., Transferrin- and folate-modified, double-targeted nanocarriers for gene delivery. *Pharm Biol* **2014**, 52, (5), 570-574.
149. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Akita, H.; Harashima, H., Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* **2006**, 58, (1), 32-45.
150. Kunisawa, J.; Masuda, T.; Katayama, K.; Yoshikawa, T.; Tsutsumi, Y.; Akashi, M.; Mayumi, T.; Nakagawa, S., Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J Control Release* **2005**, 105, (3), 344-353.
151. Tu, Y.; Kim, J. S., A fusogenic segment of glycoprotein H from herpes simplex virus enhances transfection efficiency of cationic liposomes. *J Gene Med* **2008**, 10, (6), 646-654.
152. Munyendo, W. L.; Lv, H.; Benza-Ingoula, H.; Baraza, L. D.; Zhou, J., Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals. *Biomolecules* **2012**, 2, (2), 187-202.
153. Malhotra, M.; Tomaro-Duchesneau, C.; Saha, S.; Kahouli, I.; Prakash, S., Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *Int J Nanomedicine* **2013**, 8, (2041-2052).
154. Christiaens, B.; Dubrue, P.; Grooten, J.; Goethals, M.; Vandekerckhove, J.; Schacht, E.; Rosseneu, M., Enhancement of polymethacrylate-mediated gene delivery by Penetratin. *Eur J Pharm Sci* **2005**, 24, (5), 525-537.
155. Lehto, T.; Simonson, O. E.; Mager, I.; Ezzat, K.; Sork, H.; Copolovici, D.-M.; Viola, J. R.; Zaghloul, E. M.; Lundin, P.; Moreno, P. M. D.; Mae, M.; Oskolkov, N.; Suhorutsenko, J.; Smith, C. I. E.; Andaloussi, S. E. L., A peptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther* **2011**, 19, (8), 1457-1467.
156. Opanasopit, P.; Tragulpakseerojn, J.; Apirakaramwong, A.; Ngawhirunpat, T.; Rojanarata, T.; Ruktanonchai, U., The development of poly-L-arginine-coated liposomes for gene delivery. *Int J Nanomedicine* **2011**, 6, 2245-2252.
157. Morris, M. C.; Chaloin, L.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G., A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res* **1999**, 27, (17), 3510-3517.

158. Rudolph, C.; Plank, C.; Lausier, J.; Schillinger, U.; Muller, R. H.; Rosenecker, J., Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J Biol Chem* **2003**, 278, (13), 11411-11418.
159. Duchardt, F.; Fotin-Mleczek, M.; Schwarz, H.; Fischer, R.; Brock, R., A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **2007**, 8, (7), 848-866.
160. Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J., Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J Control Release* **2011**, 151, (3), 220-228.
161. Hillaireau, H.; Couvreur, P., Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* **2009**, 66, (17), 2873-2896.
162. Lechardeur, D.; Lukacs, G. L., Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: A perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum Gene Ther* **2006**, 17, (9), 882-889.
163. Behr, J. P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* **1997**, 51, 34-36.
164. Medina-Kauwe, L. K.; Xie, J.; Hamm-Alvarez, S., Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther* **2005**, 12, (24), 1734-1751.
165. Midoux, P.; Monsigny, M., Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem* **1999**, 10, (3), 406-411.
166. Zelphati, O.; Szoka, F. C., Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (21), 11493-11498.
167. Hafez, I. M.; Cullis, P. R., Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 47, (2-3), 139-148.
168. Labat-Moleur, F.; Steffan, A. M.; Brisson, C.; Perron, H.; Feugeas, O.; Furstenberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E.; Behr, J. P., An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* **1996**, 3, (11), 1010-1017.
169. Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O.; Safinya, C. R., An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **1998**, 281, 78-81.
170. Wagner, E.; Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Birnstiel, M. L., Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: Toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89, (17), 7934-7938.
171. Li, W.; Nicol, F.; Szoka Jr, F. C., GALA: A designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, 56, (7), 967-985.
172. Soltani, F.; Sankian, M.; Hatefi, A.; Ramezani, M., Development of a novel histone H1-based recombinant fusion peptide for targeted non-viral gene delivery. *Int J Pharm* **2013**, 441, (1-2), 307-315.
173. Gabrielson, N. P.; Pack, D. W., Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *J Control Release* **2009**, 136, (1), 54-61.
174. Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J., Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* **1995**, 270, (32), 18997-19007.
175. Pollard, H.; Remy, J. S.; Loussouarn, G.; Demolombe, S.; Behr, J. P.; Escande, D., Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* **1998**, 273, (13), 7507-7511.
176. Bieber, T.; Meissner, W.; Kostin, S.; Niemann, A.; Elsasser, H.-P., Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release* **2002**, 82, (2-3), 441-454.
177. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (9), 5177-5181.
178. Gosselin, M. A.; Guo, W.; Lee, R. J., Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, (6), 989-994.

179. Lukacs, G. L.; Haggie, P.; Seksek, O.; Lechardeur, D.; Freedman, N.; Verkman, A. S., Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **2000**, 275, (3), 1625-1629.
180. Vaughan, E. E.; Dean, D. A., Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther* **2006**, 13, (2), 422-428.
181. Badding, M. A.; Vaughan, E. E.; Dean, D. A., Transcription factor plasmid binding modulates microtubule interactions and intracellular trafficking during gene transfer. *Gene Ther* **2012**, 19, (3), 338-346.
182. Erin, E. V.; Geiger, R. C.; Aaron, M. M.; Phoebe, L. L.-M.; Takayoshi, S.; Naoki, M.; David, A. D., Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Mol Ther* **2008**, 16, (11), 1841-1847.
183. Leopold, P. L.; Pfister, K. K., Viral strategies for intracellular trafficking: motors and microtubules. *Traffic* **2006**, 7, (5), 516-523.
184. Radtke, K.; Dohner, K.; Sodeik, B., Viral interactions with the cytoskeleton: A hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* **2006**, 8, (3), 387-400.
185. Suh, J.; Wirtz, D.; Hanes, J., Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (7), 3878-3882.
186. Doyle, S. R.; Chan, C. K., Differential intracellular distribution of DNA complexed with polyethylenimine (PEI) and PEI-polyarginine PTD influences exogenous gene expression within live COS-7 cells. *Genet Vaccines Ther* **2007**, 5, 11.
187. Barua, S.; Rege, K., The influence of mediators of intracellular trafficking on transgene expression efficacy of polymer-plasmid DNA complexes. *Biomaterials* **2010**, 31, (22), 5894-5902.
188. Ondrej, V.; Lukasova, E.; Falk, M.; Kozubek, S., The role of actin and microtubule networks in plasmid DNA intracellular trafficking. *Acta Biochim Pol* **2007**, 54, (3), 657-663.
189. Cohen, R. N.; van der Aa, M. A.; Macaraeg, N.; Lee, A. P.; Szoka Jr, F. C., Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *J Control Release* **2009**, 135, (2), 166-174.
190. Glover, D. J.; Leyton, D. L.; Moseley, G. W.; Jans, D. A., The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell level. *J Gene Med* **2010**, 12, (1), 77-85.
191. Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotten, M.; Saltik, M.; Wagner, E., Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* **2000**, 7, (5), 401-407.
192. Abdallah, B.; Hassan, A.; Benoist, C.; Goula, D.; Behr, J. P.; Demeneix, B. A., A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: Polyethylenimine. *Hum Gene Ther* **1996**, 7, (16), 1947-1954.
193. Suntharalingam, M.; Wenthe, S. R., Peering through the pore: Nuclear Pore Complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* **2003**, 4, (6), 775-789.
194. Kalderon, D.; Roberts, B. L.; Richardson, W. D.; Smith, A. E., A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **1984**, 39, (3, Part 2), 499-509.
195. Lam, A. P.; Dean, D. A., Progress and prospects: Nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther* **2010**, 17, (4), 439-447.
196. Collas, P.; Husebye, H.; Aleström, P., The nuclear localization sequence of the SV40 T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. *Transgenic Res* **1996**, 5, (6), 451-458.
197. Keller, M.; Harbottle, R. P.; Perouzel, E.; Colin, M.; Shah, I.; Rahim, A.; Vaysse, L.; Bergau, A.; Moritz, S.; Brahimi-Horn, C.; Coutelle, C.; Miller, A. D., Nuclear localization sequence templated nonviral gene delivery vectors: Investigation of intracellular trafficking events of LMD and LD vector systems. *ChemBioChem* **2003**, 4, (4), 286-298.
198. Chan, C. K.; Jans, D. A., Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: Polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Hum Gene Ther* **1999**, 10, (10), 1695-1702.

199. Matschke, J.; Bohla, A.; Maucksch, C.; Mittal, R.; Rudolph, C.; Rosenecker, J., Characterization of Ku70(2)-NLS as bipartite nuclear localization sequence for non-viral gene delivery. *PLoS ONE* **2012**, 7, (2), e24615.
200. Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P., Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, (1), 91-96.
201. Ciolina, C.; Byk, G.; Blanche, F.; Thuillier, V.; Scherman, D.; Wils, P., Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjug Chem* **1999**, 10, (1), 49-55.
202. van der Aa, M. A.; Koning, G. A.; d'Oliveira, C.; Oosting, R. S.; Wilschut, K. J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J., An NLS peptide covalently linked to linear DNA does not enhance transfection efficiency of cationic polymer based gene delivery systems. *J Gene Med* **2005**, 7, (2), 208-217.
203. Dean, D. A., Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* **1997**, 230, (2), 293-302.
204. Dean, D. A.; Dean, B. S.; Muller, S.; Smith, L. C., Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* **1999**, 253, (2), 713-722.
205. DeGiulio, J. V.; Kaufman, C. D.; Dean, D. A., The SP-C promoter facilitates alveolar type II epithelial cell-specific plasmid nuclear import and gene expression. *Gene Ther* **2010**, 17, (4), 541-549.
206. Miller, A. M.; Dean, D. A., Cell-specific nuclear import of plasmid DNA in smooth muscle requires tissue-specific transcription factors and DNA sequences. *Gene Ther* **2008**, 15, (15), 1107-1115.
207. van Gaal, E. V. B.; Oosting, R. S.; van Eijk, R.; Bakowska, M.; Feyen, D.; Kok, R. J.; Hennink, W. E.; Crommelin, D. J. A.; Mastrobattista, E., DNA nuclear targeting sequences for non-viral gene delivery. *Pharm Res* **2011**, 28, (7), 1707-1722.
208. Gill, D. R.; Pringle, I. A.; Hyde, S. C., Progress and prospects: The design and production of plasmid vectors. *Gene Ther* **2009**, 16, (2), 165-171.
209. Herweijer, H.; Zhang, G.; Subbotin, V. M.; Budker, V.; Williams, P.; Wolff, J. A., Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J Gene Med* **2001**, 3, (3), 280-291.
210. Collas, P., Modulation of plasmid DNA methylation and expression in zebrafish embryos. *Nucleic Acids Res* **1998**, 26, (19), 4454-4461.
211. Hackett, P. B., Integrating DNA vectors for gene therapy. *Mol Ther* **2007**, 15, (1), 10-12.
212. VandenDriessche, T.; Ivics, Z.; Izsvák, Z.; Chuah, M. K. L., Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells. *Blood* **2009**, 114, (8), 1461-1468.
213. Hackett, P. B.; Largaespada, D. A.; Cooper, L. J. N., A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* **2010**, 18, (4), 674-683.
214. Singh, H.; Huls, H.; Cooper, L. J. N., A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19. *Immunol Rev* **2014**, 257, (1), 181-190.

PARTIE II : ELABORATION DE VIRUS SYNTHETIQUES
POUR L'AMELIORATION DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DU GENE

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Pour que les vecteurs synthétiques représentent une réelle alternative à la transfection par les vecteurs viraux, il faut avant tout les rendre plus efficaces. Conduire à l'élaboration de vecteurs plus efficaces nécessite d'optimiser chacune des étapes du processus de transfection. Ainsi, comme nous l'avons présenté dans la partie bibliographique, de nombreuses études ont permis d'améliorer la diffusion, la furtivité, la délivrance spécifique dans des cellules cibles ou encore l'import nucléaire des complexes d'ADN. En revanche, l'amélioration de leur trafic intracellulaire depuis la sortie de l'endosome jusqu'au noyau n'a, *a priori*, été abordée que très succinctement. L'hypothèse avancée la plus probable suggère que ces entités utilisent le réseau du cytosquelette de la cellule pour se mouvoir à l'intérieur du cytoplasme. En particulier, ces objets à la sortie de l'endosome (ou les endosomes les contenant), utiliseraient les microtubules et leurs moteurs moléculaires associés tels que les dynéines pour atteindre le noyau cellulaire.

De nombreux virus ainsi que des protéines impliquées dans des processus cellulaires normaux bénéficient d'un transport cytosolique actif vers le noyau par les microtubules *via* la dynéine. En effet, de multiples études ont mis en avant l'existence de fortes interactions entre divers polypeptides d'origine cellulaire et virale et des sous-unités de la dynéine. Ainsi, le développement de vecteurs synthétiques fonctionnalisés par de tels peptides serait une alternative de choix pour améliorer leur trafic intracellulaire en tirant profit des dynéines et du réseau de microtubules. Il s'en suivrait une augmentation de la concentration périnucléaire des complexes qui devrait faciliter leur import nucléaire et, *in fine*, conduire à de meilleurs taux de transfection. Cette fonctionnalisation a fait l'objet du sujet de thèse qui m'a été confié. Dans ce chapitre, nous décrirons tout d'abord les acteurs du cytosquelette et du réseau de transport intracellulaire, puis nous développerons les objectifs et les différentes stratégies envisagées pour mener à bien ce travail de thèse.

I. CYTOSQUELETTE ET TRAFIC INTRACELLULAIRE

I.1 CYTOSQUELETTE¹

Le cytosquelette est un ensemble complexe de polymères protéiques fibreux présents dans toutes les cellules eucaryotes. Il comprend trois types de filaments formant des réseaux classés selon le diamètre de la structure protéique, ainsi que les protéines accessoires qui leur sont associées. On distingue les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules sur lesquelles nous nous attarderons principalement (**Figure 1**). Ces structures sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux (maintien de la forme de la cellule, mitose, transports, mouvements...).

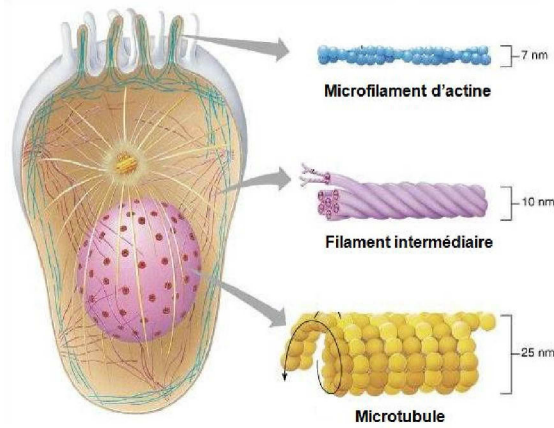


Figure 1 : Structure générale du cytosquelette

I.1.1 FILAMENTS D'ACTINE²

Les filaments d'actine ou microfilaments sont de fines fibres issues de la polymérisation d'une protéine globulaire, l'actine G. Ils constituent un réseau sous la membrane plasmique, en périphérie de la cellule. La polymérisation se fait en présence d'ATP et conduit à un filament de 7 nm de diamètre environ, en double hélice et polarisé. Les microfilaments sont des structures dynamiques et instables puisque la polymérisation est réversible. Ils se trouvent principalement impliqués dans les fonctions de mobilité cellulaire, dans la contraction musculaire, ainsi que dans le trafic intracellulaire en association avec les myosines (cf. **paragraphe I.2.1.1**).

I.1.2 FILAMENTS INTERMÉDIAIRES³

Les filaments intermédiaires sont issus d'un assemblage successif de structures de plus en plus complexes. D'un diamètre compris entre 8 et 10 nm, ils comportent huit protofilaments ; chacun étant un assemblage de deux unités tétramériques. Ils forment des réseaux fibreux qui s'étendent du noyau jusqu'à la membrane plasmique. Contrairement aux microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires ne sont pas polarisés. Quatre familles principales de protéines entrent dans leur constitution, à savoir les kératines, les vimentines et apparentés, les lamines et les neurofilaments. Leur fonction est le maintien de la forme de la cellule.

I.1.3 MICROTUBULES

Les microtubules (MTs) sont le dernier constituant principal du cytosquelette des cellules eucaryotes. Les MTs sont des fibres cylindriques creuses qui résultent de la polymérisation d'une protéine globulaire, la tubuline. La phase de nucléation repose sur l'assemblage de deux types de monomères protéiques que sont l' α - et la β -tubuline pour conduire à des hétérodimères d' α,β -tubuline. Intervient ensuite une phase de polymérisation pendant laquelle ces dimères s'associent tête-bêche et permettent l'élongation d'un protofilament. Les protofilaments, au nombre de treize, s'assemblent latéralement pour former un feuillet qui se replie en MT de 25 nm de diamètre. Le MT

est une structure polarisée avec une extrémité (+) à croissance rapide, et une extrémité (-) à polymérisation lente (**Figure 2**).

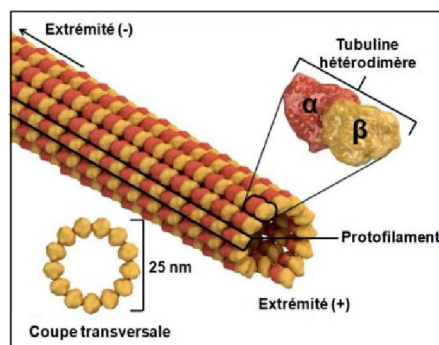


Figure 2 : Structure schématique d'un microtubule

La dernière phase dite d'élongation du MT consiste en l'ajout de dimères par polymérisation à l'extrémité (+). La polymérisation de la tubuline en MT se fait en présence de GTP, porté par les monomères de tubuline.⁴ Concernant l'extrémité (-), elle est ancrée au centre organisateur de microtubules (*microtubule-organizing center*, MTOC) ou centrosome, situé à proximité du noyau cellulaire. Ce MTOC constitue la base de nucléation des MTs, et contient d'autres types de tubuline (γ , δ , ϵ). Le principal acteur de la nucléation est la γ -tubuline,⁵ dont la concentration dans l'espace péricentriolaire du centrosome est élevée. Ainsi, l'organisation du réseau microtubulaire se constitue à partir du MTOC (extrémité (-)) jusqu'en périphérie cellulaire à proximité des filaments d'actine (extrémité (+)), selon une disposition radiale (**Figure 3**). Tout comme les microfilaments d'actine, les MTs sont des structures polymériques instables puisque l'extrémité (+) alterne dans le temps des phases de polymérisation et de dépolymérisation.⁶ Les fonctions des MTs sont nombreuses, et leur intégrité est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Elles participent par exemple au maintien de la forme cellulaire en assurant la stabilité du cytosquelette, et interviennent aussi dans le transport de vésicules et organites cellulaires par l'intermédiaire de moteurs moléculaires. Ce rôle des MTs dans les mécanismes de transport actif a été exploité par notre équipe pour améliorer le déplacement cytosolique de complexes d'ADN.

I.2 RESEAU DE TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Le transport cytoplasmique repose sur le vaste réseau de filaments polarisés d'actines et de microtubules constitutif du cytosquelette de la cellule. Ce transport, de type actif, est assuré par des protéines que l'on qualifie de moteurs moléculaires qui se déplacent le long du cytosquelette. Ces moteurs moléculaires sont capables de transformer une énergie chimique liée à l'hydrolyse d'ATP en une force mécanique. Certains d'entre eux se lient aux filaments d'actine (en rouge, **Figure 3**) et sont membres de la superfamille des myosines, alors que d'autres s'associent aux microtubules (en vert, **Figure 3**) et font partie de la superfamille des kinésines et des dynéines.

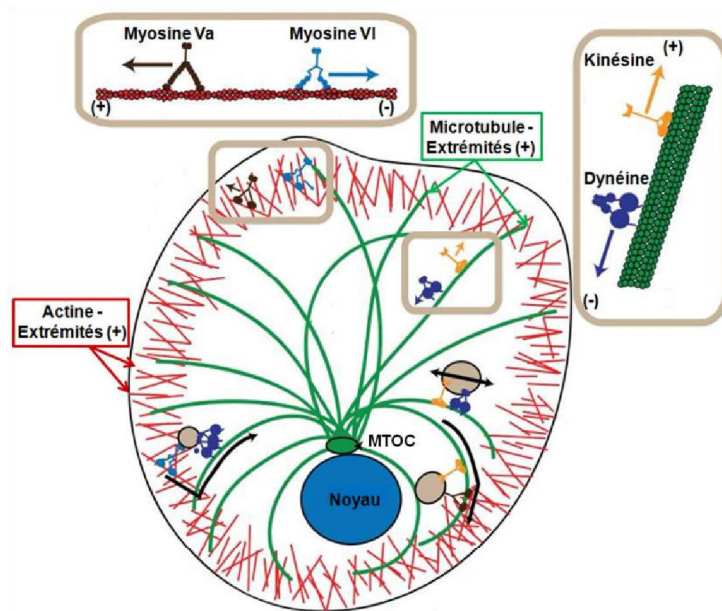


Figure 3 : Cellule à disposition radiale, modifié d'après⁷

Par la suite, nous nous étendrons plus en détails sur les moteurs moléculaires liés aux microtubules que sont les dynéines, qui assurent un transport actif dit rétrograde, depuis la périphérie jusqu'au noyau cellulaire.

I.2.1 MOTEURS MOLECULAIRES

I.2.1.1 ASSOCIES A L'ACTINE : MYOSINES⁸

Les moteurs moléculaires qui se lient à l'actine font partie de la superfamille des myosines. Ce sont des homodimères protéiques où chaque monomère est une chaîne lourde de la myosine. Cette chaîne lourde est constituée de trois sous-domaines fonctionnels : une tête ou domaine moteur qui porte l'activité ATPasique, un cou de longueur variable, et une queue qui se lie aux molécules cargos. A l'heure actuelle, cette superfamille comprend dix-huit classes distinctes de myosines. Alors que le domaine moteur est très conservé d'une classe à l'autre, une grande variabilité de séquence est observée au niveau des queues. Cette divergence confère une certaine spécificité aux myosines pour le cargo à déplacer. Les myosines sont généralement impliquées dans un transport antérograde, c'est-à-dire de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des filaments d'actine. Une seule exception existe, il s'agit de la myosine VI qui produit un mouvement rétrograde, dirigé vers l'extrémité (-) des filaments d'actine.

I.2.1.2 ASSOCIES AUX MICROTUBULES : KINESINES ET DYNEINES

- Kinésines⁹

Les kinésines sont principalement responsables du mouvement antérograde (du noyau vers la périphérie) le long des microtubules. Elles appartiennent à une superfamille subdivisée en quatorze classes distinctes. Les membres de cette superfamille possèdent un domaine moteur très conservé

qui porte les sites de liaison à l'ATP et aux microtubules. Les autres domaines structuraux sont variables et spécifiques d'une classe particulière de kinésine. Les kinésines conventionnelles ou kinésine-1 sont des homodimères de chaînes lourdes auxquelles sont associées des chaînes légères. Les chaînes lourdes comportent un domaine tête suivi d'un domaine cou, d'une tige et d'un domaine queue permettant la liaison au cargo. Les kinésines non-conventionnelles diffèrent par leur structure, avec une modification dans certains cas de la place du cœur catalytique, ou du niveau de complexation (dimère, trimère...). La kinésine-2 par exemple existe sous forme d'un hétérotrimère constitué de deux chaînes lourdes et d'une molécule accessoire. Ces modifications structurales induisent des variations dans l'activité telles qu'un changement du sens de déplacement ou de sa vitesse le long des microtubules. Par exemple, une petite famille, la kinésine-14, fait exception et se déplace en sens rétrograde, donc inversé par rapport aux autres.

- Dynéines¹⁰

Les dynéines sont des moteurs moléculaires responsables du transport rétrograde (de la périphérie vers le noyau) le long des microtubules. On distingue deux types de dynéines, à savoir les dynéines flagellaires et les dynéines cytoplasmiques. Les dynéines flagellaires sont impliquées dans le mouvement des cils ou des flagelles. Les dynéines cytoplasmiques sont, quant à elles, ubiquitaires. Il existe deux types de dynéines cytoplasmiques, mais seules les caractéristiques de la dynéine cytoplasmique de type 1 seront abordées. Ainsi, dans la suite de ce chapitre, le terme dynéine s'appliquera uniquement à la dynéine cytoplasmique de type 1.

La dynéine est un grand complexe multiprotéique de 1,5 MDa formé de deux chaînes lourdes et de diverses chaînes intermédiaires et légères. Le complexe comprend six sous-unités homodimériques distinctes réparties en deux domaines structuraux, à savoir un domaine moteur et un domaine cargo (Figure 4).

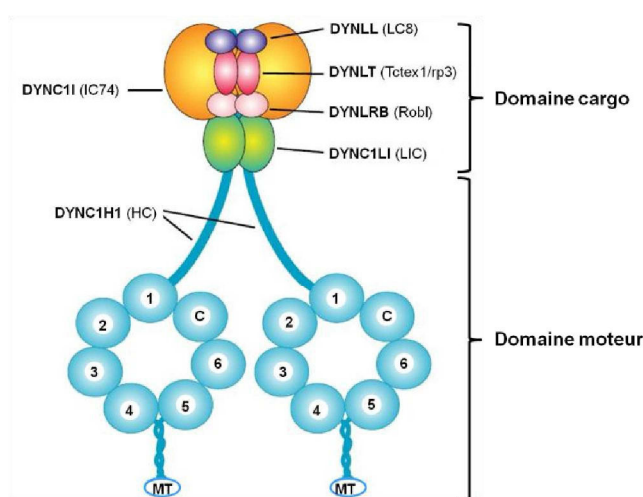


Figure 4 : Structure de la dynéine cytoplasmique de type 1 chez les cellules eucaryotes, modifié d'après¹¹

Le domaine moteur (en bleu) est constitué par un homodimère de chaînes lourdes DYNC1H1 (*Heavy Chains*, HC) de 530 kDa. A chaque extrémité C-terminale de ces chaînes lourdes se trouve une grosse

tête globulaire, structure sphéroïde composée de sept domaines arrangés autour d'une cavité centrale. Six d'entre eux sont des domaines AAA (Activité cellulaire variée ATPase Associée) qui portent l'activité ATPasique permettant le mouvement. La dynéine interagit directement avec les microtubules *via* un petit domaine globulaire porté par une fine tige située entre les domaines AAA4 et AAA5. A la base de ce domaine moteur se trouve le domaine cargo, qui comprend :

- un dimère de **chaînes légères intermédiaires** DYNC1LI (*Light Intermediate Chains, LIC*) de 59 kDa (en vert)
- un dimère de **chaînes intermédiaires** DYNC1I (*Intermediate Chains, IC*) de 74 kDa (en orange)
- trois différents dimères de **chaînes légères** (*Light Chains, LC*) qui se lient aux chaînes intermédiaires : RoadBlock (LC7 ou DYNLRB) (en rose), Tctex1 (DYNLT) (en fuchsia) et LC8 (DYNLL) (en mauve).

Notons que la dynéine se lie de façon indirecte à certains cargos par l'intermédiaire d'un complexe protéique additionnel, la dynactine, qualifiée de cofacteur de la dynéine.

Complexe de la dynactine

La dynactine est un complexe multiprotéique de 1,2 MDa constitué de onze sous-unités polypeptidiques distinctes. Ces sous-unités lui permettent d'interagir avec les microtubules, le complexe de la dynéine ainsi que les cargos devant être transportés (**Figure 5**). Parmi elles se trouve la protéine p150^{Glued} (en gris), hélice α terminée par une petite extrémité globulaire, qui forme un bras latéral au complexe. Cette protéine est indispensable à la liaison aux microtubules, et interagit aussi avec le dimère IC du domaine cargo de la dynéine. Citons également le filament Arp1 (en rouge), de structure octamérique, qui permet la liaison au cargo.

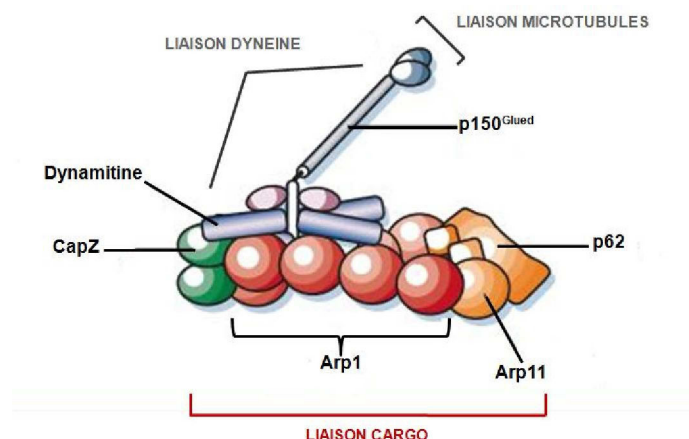


Figure 5 : Représentation schématique du complexe de la dynactine, modifié d'après¹²

Importance de la chaîne LC8¹³

La chaîne LC8 de la dynéine est une chaîne légère hautement conservée et ubiquitaire. Tout comme la dynactine, elle est liée au dimère IC du complexe de la dynéine, et permet l'interaction avec de nombreux cargos. Sa structure secondaire est composée de deux hélices α antiparallèles à

l'extrémité *N*-terminale, et de cinq feuillets β antiparallèles à l'extrémité *C*-terminale (**Figure 6, A**). Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ comportent des résidus acides et basiques, respectivement, formant une poche polaire au sein de la structure. Au contraire, les feuillets β forment la partie apolaire de la protéine.

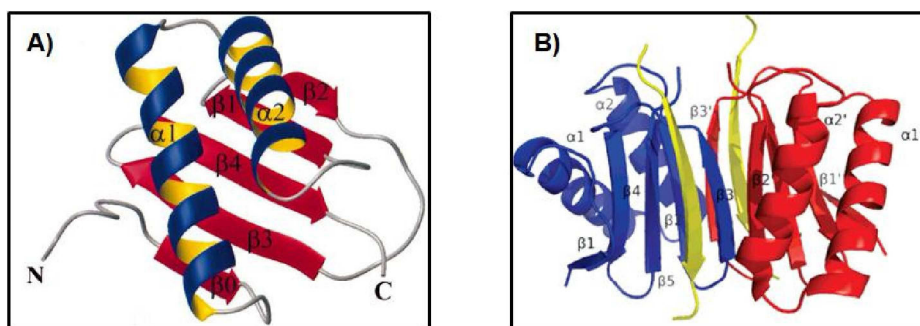


Figure 6 : A) structure secondaire de la chaîne légère LC8 de la dynéine ;
B) structure du dimère LC8 (en bleu-rouge) liant un peptide Swallow (en jaune)

LC8 se trouve sous forme d'un homodimère qui permet l'association avec divers ligands protéiques (**Figure 6, B**). En effet, il a été montré que de nombreuses protéines utilisent la dynéine par la mise en place d'un complexe ternaire IC-LC8-cargo pouvant inclure ou non la dynactine. Les protéines se liant à LC8 partagent dans leur séquence un motif consensus extrêmement conservé, du type (K/R)XTQT ou G(I/V)QVD (**Tableau 1**). La glutamine (Q) présente dans les deux motifs occupe une position centrale puisqu'elle forme une liaison hydrogène avec le premier résidu de l'hélice $\alpha 2$ de LC8, lui-même étant extrêmement conservé dans différentes espèces. Néanmoins, des cas particuliers existent, comme la protéine Grin1A, pour lesquels le motif de liaison à LC8 est dépourvu de glutamine (Q).¹⁴

De même que pour LC8, l'homodimère de chaînes légères Tctex1 de la dynéine assure le recrutement de cargos par l'intermédiaire d'une séquence consensus.¹⁵ Les séquences protéiques hautement conservées connues pour interagir avec les chaînes légères de la dynéine sont appelées DLC-AS (*Dynein Light Chain Association Sequence*). Dans la suite du manuscrit, nous appellerons DLC8-AS, les séquences interagissant avec les chaînes LC8.

Tableau 1 : Séquences se liant à LC8 identifiées chez certaines protéines cellulaires, adapté de¹³

Protéine	Organisme	DLC8-AS
BimEL	Humain	PMSCDKSTQTP
Swallow	Drosophile	TLVYTKQTQTT
Egalitarian (Egl)	Drosophile	VKLVDAESQTL
Nnos	Humain	AEMKDTGIQVD
Grin1A	Humain	TEVETREIGVG

Des études récentes semblent démontrer que les chaînes LC8 n'agissent pas comme les éléments cargo qu'on les pensait être, mais plutôt comme un système modulable central et fondamental capable de promouvoir la multivalence par effet chélate. En effet, une proportion significative des LC8 ne se trouve pas associée au complexe de la dynéine,¹⁶ mais plutôt sous forme dissociée monomérique. D'autre part, des études RMN et cristallographiques révèlent que la liaison de LC8 à la

dynéine par l'intermédiaire des IC implique le même motif consensus.¹⁷ Ceci soulève donc une question importante : comment les LC8 pourraient-elles, par l'intermédiaire de la même séquence, se lier à la fois à la dynéine (IC) et transporter des cargos possédant des DLC8-AS ?

De façon intéressante, il existe un certain nombre de preuves qui démontrent que les chaînes LC8 sont capables de former des complexes multivalents. Par exemple, cinq homodimères de Dyn2 (orthologues de LC8) peuvent interagir pour stabiliser et promouvoir la dimérisation de Nup159, un composant du complexe du pore nucléaire (NPC).¹⁸ *In vitro*, il a été démontré que des sous unités LC8 de rats pouvaient former des « dimères de dimères ». ¹⁹ D'une façon similaire, ces tétramères ont été observés sur des LC8 humaines par chromatographie d'exclusion.²⁰ La majorité des études récentes présente LC8 comme une protéine centrale capable de promouvoir, par le biais de la dimérisation, la multivalence de ses partenaires et favoriser ainsi leur auto-association.^{13, 21} En se basant sur ces données, un modèle possible pour expliquer le paradoxe de l'existence d'une séquence consensus commune à IC et aux DLC8-AS serait que LC8 joue le rôle de cargo par l'intermédiaire d'une tétramérisation transitoire. Ainsi, un homodimère LC8 serait lié au moteur de la dynéine *via* IC tandis que le second homodimère LC8 interagirait avec les DLC8-AS.

II. UTILISATION DU CYTOSQUELETTE PAR LES VIRUS²²

Les virus sont dotés de la capacité à contourner les barrières intracellulaires. En effet, ils utilisent le cytosquelette et notamment les MTs associées aux kinésines et dynéines pour se déplacer efficacement dans la cellule.²³ Leur transport est bidirectionnel et peut se faire aussi bien dans le sens rétrograde, que dans le sens antérograde. Ainsi, ils se déplacent en direction du noyau pour y transférer leur matériel génétique grâce aux dynéines. A l'inverse, le bourgeonnement du virus et l'infection d'autres cellules peuvent se faire grâce aux kinésines, qui assurent les déplacements vers la périphérie cellulaire. Les vecteurs viraux, tout comme les virus naturels, bénéficient d'un transport cytosolique actif vers le noyau qui explique en partie leur grande efficacité en thérapie génique. De façon similaire aux protéines cellulaires (Swallow, Egl...), de nombreuses protéines virales présentent des séquences DLC-AS de liaison aux chaînes légères de la dynéine, et notamment à LC8.²⁴ En effet, les motifs consensus (K/R)XTQT et G(I/V)QVD permettent aux virus de recruter la dynéine et d'utiliser le réseau microtubulaire. Parmi ces deux motifs, (K/R)XTQT a plus particulièrement été identifié chez de nombreux virus (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Séquences virales interagissant avec LC8 identifiées chez certains virus, adapté de¹³

Protéine	Virus	DLC8-AS
ADE41	Adénovirus	CITLVKSTQTV
VP35	Virus Ebola	PKTRNSQTQTD
UL9	Virus Herpès Humain type 1	GVQMAKSTQTF
U19	Virus Herpès Humain type 7	TILVSRSTQTG LGHFTRSTQTS
Protéine P	Virus Mokola	KSTEDKSTQTP
E4	Papillomavirus	DHHQDKQTQTP

III. UTILISATION DU CYTOSQUELETTE PAR DES NANOPARTICULES OU DES VECTEURS SYNTHETIQUES FONCTIONNALISES

Comme nous l'avons vu précédemment (**paragraphe I.2.1.2, Importance de la chaîne LC8**), les DLC-AS sont des séquences protéiques permettant le transport actif de protéines cellulaires et de virus *via* une interaction avec les chaînes légères de la dynéine. Les DLC8-AS requises pour une interaction avec le dimère LC8 de la dynéine contiennent les séquences minimales (K/R)XTQT ou G(I/V)QVD. Ainsi, le développement de nanoparticules ou de vecteurs synthétiques fonctionnalisés par l'une ou l'autre de ces séquences représente une alternative de choix pour améliorer le trafic intracellulaire jusqu'au noyau. Leur transport actif pourrait conduire à une augmentation de leur nombre autour du noyau et, dans le cas de vecteurs de gènes non viraux, à une transfection plus efficace.

III.1 UTILISATION DE FLUOSPHERES FONCTIONNALISEES

Des travaux précédents au laboratoire, réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr S. Noselli (Institut de Biologie Valrose, IBV), ont consisté à utiliser un modèle simplifié sans ADN, à base de nanoparticules organiques, pour évaluer l'impact de différentes séquences DLC8-AS ciblant LC8 sur la localisation périnucléaire.²⁵ Ainsi, diverses séquences DLC8-AS ont été conjuguées à un PEG puis greffées sur des fluosphères en polystyrène (FSs) (**Figure 7**) avant d'être microinjectées dans le cytoplasme d'oocytes de drosophile.

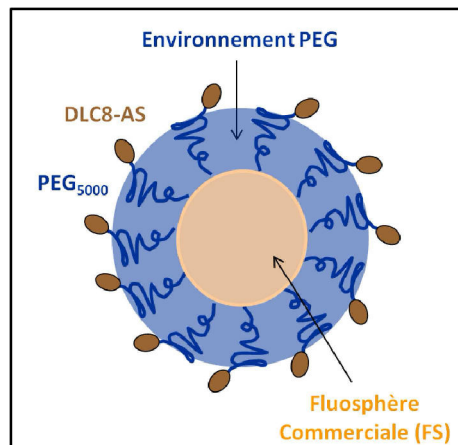


Figure 7 : Représentation schématique des fluosphères fonctionnalisées

Les résultats ont montré que les séquences DLC8-AS présentant le motif consensus (K/R)XTQT permettaient une accumulation périnucléaire rapide des FSs, et ce grâce à un mécanisme dynéine et microtubule dépendant. Ces travaux ont aussi démontré que la localisation périnucléaire des FSs était dépendante du nombre de motifs consensus en surface des nanoparticules. En effet, en passant de 10 à 100% de fonctionnalisation, l'accumulation des FSs autour du noyau a été améliorée de façon significative (**Figure 8**). Les DLC8-AS contenant un motif consensus de liaison à LC8 sont donc de bons candidats pour augmenter la concentration périnucléaire des FSs, à condition d'avoir de hauts taux de fonctionnalisation.

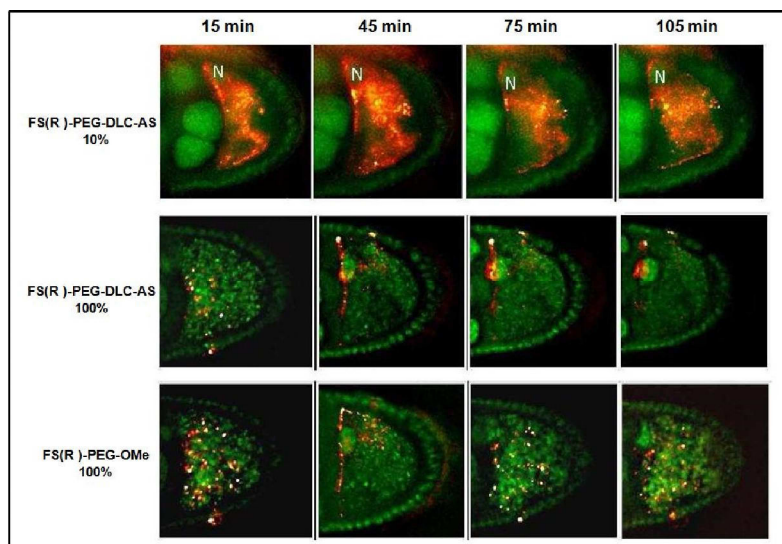


Figure 8 : Localisation des fluosphères (rouges) lors des injections intracytoplasmiques
FS(R)-PEG-DLC-AS 10% : mélange de fluosphères contenant [FS(R)-PEG₂₀₀₀-OMe/FS(R)-PEG₅₀₀₀-DLC8-AS 90/10] ;
FS(R)-PEG-DLC-AS 100%: fluosphères fonctionnalisées seulement par des conjugués PEG₅₀₀₀-DLC8-AS
FS(R)-PEG-OMe 100% : fluosphères non fonctionnalisées PEG₅₀₀₀-OMe

III.2 UTILISATION DE VECTEURS NON VIRALIS FONCTIONNALISÉS

Peu d'études font état du transport cytosolique de l'ADN plasmidique, des polyplexes et des lipoplexes. L'hypothèse principalement retenue repose sur l'utilisation du réseau du cytosquelette de la cellule. Les polyplexes de PEI se localisent *a priori* autour du noyau suite à un transport actif grâce aux microtubules (cf. **partie I, paragraphe IV.3.2.2**). Toutefois, il est plus probable que ces observations soient le résultat d'un transport des endosomes renfermant les polyplexes, plutôt que des polyplexes directement.²⁶

L'idée d'exploiter la dynéine pour améliorer les méthodes non virales de transfert de gènes est assez récente. A ce jour, peu de travaux reposant sur cette stratégie ont pu être recensés. Les méthodes employées visent principalement à cibler les chaînes légères de la dynéine, et principalement LC8. En 2007, Alonso et *al* ont appliqué cette stratégie de façon indirecte, en utilisant des séquences protéiques reconnues par LC8 pour diminuer la liaison LC8/virus et inhiber l'infection virale *in vitro*.²⁷ La même année, Moseley et *al* ont montré que la séquence DLC8-AS (KSTQT) de la phosphoprotéine du virus de la rage (RPP), en synergie avec sa séquence NLS, facilitait l'accumulation et l'import nucléaire de la protéine *via* une interaction avec la dynéine.²⁸ Ces travaux sont à l'origine des premières études visant à utiliser des séquences DLC8-AS pour le transfert de gènes. C'est d'ailleurs cette même équipe qui, en 2010, a montré la possibilité d'améliorer la translocation nucléaire de cargos exogènes grâce à l'utilisation de séquences DLC8-AS, en plus de peptides pénétrants.²⁹ En 2011, Tanaka et *al* ont condensé l'ADN plasmidique avec un amphiphile peptidique de type stéaroyl-CH₂R₄H₂C, et fonctionnalisé le complexe obtenu avec un peptide de 15 acides aminés (CKSSQDKSTQTTGDC).³⁰ Même si la présence du 15-mer en surface a inhibé de façon non négligeable l'internalisation des complexes, elle a eu un effet bénéfique sur l'expression du transgène. Plus récemment, Akita et *al* ont encapsulé l'ADN plasmidique dans des liposomes portant des conjugués

PEG-peptide dérivé de la protéine p54 du virus de la fièvre porcine africaine (p54₁₄₉₋₁₆₁).³¹ Les résultats montrent que les complexes dotés de la séquence conduisent à une amélioration de la transfection, grâce à une interaction avec la dynéine. Pour autant, chacune de ces études ne révèlent qu'une amélioration modeste des niveaux de transfection obtenus.

Afin de transposer la stratégie des fluosphères (exposée juste avant, **paragraphe III.1**) à un modèle de transfection, l'équipe a fonctionnalisé par des DLC8-AS des nanoparticules d'ADN à base de détergents dimérisables polycationiques et perfluoroalkylés portant des résidus cystéine. Ce type de système se révèle particulièrement adapté car il permet de condenser l'ADN de façon quasi-monomoléculaire,^{32, 33} et donc d'obtenir des NPs d'ADN de petites tailles avec une distribution monodisperse. La stratégie consiste en une formulation en deux étapes (**Figure 9**) :

- **Etape 1** : L'ADN est condensé par un détergent monocationique dimérisable et perfluoroalkylé comportant un résidu cystéine.
- **Etape 2** : La surface des NPs est fonctionnalisée par une ancre hydrophobe perfluoroalkylée et pegylée (PEG 5 kDa) portant un ligand DLC8-AS à son extrémité.

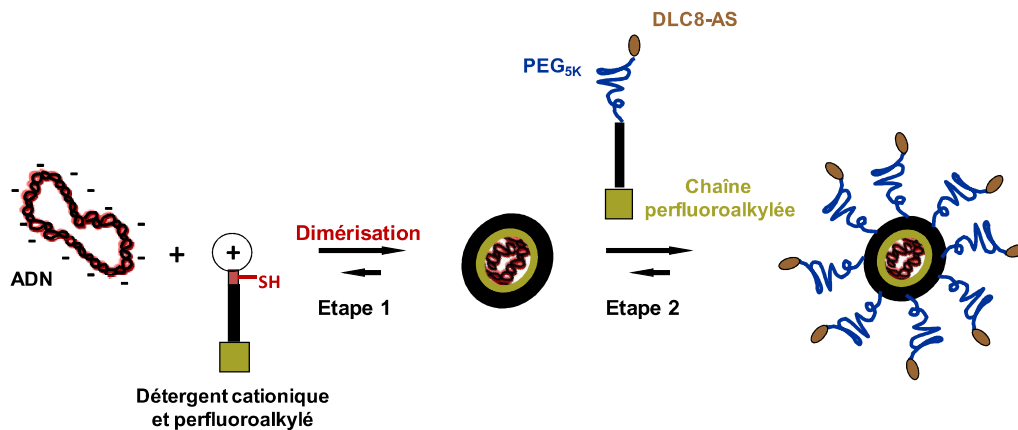


Figure 9 : Fonctionnalisation par des DLC8-AS de NPs d'ADN basées sur des résidus cystéine

Cette stratégie n'a permis d'obtenir que de faibles taux de fonctionnalisation. Par ailleurs, les injections intracytoplasmiques n'ont pas conduit à une accumulation périnucléaire des NPs. Ainsi, des taux de fonctionnalisation élevés semblent bel et bien être indispensables à la localisation périnucléaire des complexes. Ces résultats n'ont pas fait l'objet de publication.

D'autres travaux rapportent le ciblage non plus des dimères LC8 de la dynéine, mais d'autres chaînes légères par des stratégies similaires. Pigeon et al ont par exemple développé une stratégie ciblant les chaînes légères Tctel1, homologues de Tctex1.³⁴ La protéine E3-14.7K d'adénovirus interagit avec Tctel1 par l'intermédiaire de la protéine cytosolique FIP-1. L'équipe a ainsi greffé la séquence peptidique P₇₉₋₉₈ de la protéine E3-14.7K sur un ADN plasmidique. La présence de ce peptide sur l'ADN a permis une augmentation significative de l'efficacité de transfection de polyplexes, en faisant intervenir le réseau des MTs. Finalement, une autre équipe a utilisé une protéine recombinante contenant entre autres la chaîne légère de la dynéine Rp3, membres apparentés de la famille TcTex1,









pour une interaction directe avec les chaînes intermédiaires de la dynéine.³⁵ Cette protéine a permis de condenser le plasmide en une particule cationique de très petite taille. Les résultats ont montré une accumulation périnucléaire des complexes, même si la transfection est restée un peu en-deçà de la lipofectamine référence.

IV. OBJECTIF GENERAL DU PROJET

Bien que le rôle purement « cargo » des LC8 soit remis en question, il n'en demeure pas moins que ces chaînes constituent un élément central clé, hautement conservé chez la plupart des espèces (nous partageons 90% d'homologie avec la drosophile) et qu'elles sont impliquées dans le trafic intracellulaire. Dans ce contexte, et suite aux résultats contrastés de l'équipe (cf. **paragraphes III.1 et III.2**), l'objectif général de cette thèse est de tenter d'améliorer la prise en charge par LC8 des vecteurs synthétiques fonctionnalisés par des DLC8-AS pour améliorer le trafic intracellulaire de l'ADN jusqu'au noyau. Ceci pourrait contribuer à une augmentation de l'efficacité de transfection.

Les taux de fonctionnalisation élevés à l'origine des résultats remarquables obtenus avec les FSs (sphères dures) ne peuvent être envisagés dans le cas de complexes d'ADN, car ils affecteraient grandement la stabilité colloïdale. En effet, des conjugués PEG-DLC8-AS, ou plus généralement PEG-ligand, ne peuvent être utilisés qu'à hauteur de quelques mol% car ils ont un effet dramatique sur la polydispersité des formulations. Pour contourner ce problème et pouvoir se contenter de plus faibles degrés de fonctionnalisation, l'un des moyens serait d'augmenter l'affinité pour la cible. Dans ce cadre, plusieurs études qui comparent l'affinité de DLC-AS monovalents et divalents pour LC8 de la dynéine se révèlent très intéressantes.^{36, 37} Par exemple, Rapali et al ont fourni des données thermodynamiques sur l'interaction entre des protéines de surface d'un bactériophage et LC8.³⁷ Les constantes de dissociation (Kd) montrent une augmentation systématique de l'affinité vis-à-vis de LC8 lorsque l'on passe du monomère de peptide DLC-AS à sa forme dimérique (diminution du Kd jusqu'à 550 fois) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Constantes de dissociation pour les interactions LC8-DLC-AS, d'après³⁷

	DLC-AS	Kd (μM)
	Ac-GDKSTQTD	0,56
	dimeric-GSGDKSTQTD	< 0,007
	Ac-VDKSTQTD	0,07
	dimeric-GSVDKSTQTD	< 0,009
	Ac-GSRGTQTE	1,64
	dimeric-GSGSRGTQTE	< 0,003
	Ac-VSRGTQTE	0,08
	dimeric-GSVSRGTQTE	< 0,007

Dans ce contexte, nous avons donc décidé de greffer des dimères de DLC8-AS sur des nanovecteurs d'ADN. Cette stratégie devrait permettre de compenser le faible taux de fonctionnalisation requis pour maintenir la stabilité des formulations tout en favorisant l'affinité vis-à-vis de LC8 pour assurer un transport cytosolique plus efficace des NPs jusqu'au noyau. En ce qui concerne les DLC8-AS, nous

avons choisi de travailler avec le peptide nommé BS69, dont la séquence est donnée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**). Les travaux précédents sur les fluosphères fonctionnalisées ont montré que ce peptide, issu de la protéine adénovirale BS69, avait une meilleure affinité pour LC8 que d'autres DLC8-AS, et qu'il permettait une accumulation périnucléaire plus efficace.²⁵

Tableau 4 : Séquence du ligand de LC8 utilisé

Nom de code	DLC8-AS
BS69	AcétylNH-PRMLHRSTQT-CONH(CH ₂) ₅ COOH

Pour explorer ce projet, trois systèmes distincts d'agents de transfert de gènes ont été utilisés. Ces derniers ont été envisagés pour leur aptitude à donner, sous certaines conditions, une condensation quasi-monomoléculaire en ADN (~ un plasmide par particule). En d'autres termes, ces systèmes peuvent permettre d'obtenir des particules de petites tailles avec une distribution monodisperse. De façon plus théorique, de telles formulations auront plus de facilité à diffuser dans les milieux biologiques. En solution aqueuse, à température physiologique et en conditions diluées (quelques µg/mL), ce type de condensation est un équilibre réversible qui nécessite normalement des cations multivalents disposant de charges ≥ 3 (théorie de Manning³⁸).³⁹ D'un point de vue purement électrostatique, seules des charges $Z \geq 3$ permettent d'atteindre des taux de neutralisation de l'ADN $> 90\%$, qui représentent la limite au-delà de laquelle la cohésion de l'édifice par les répulsions électrostatiques n'est plus maintenue et se traduit par un effondrement de la structure supramoléculaire.⁴⁰ Si l'on considère, en plus de l'effet électrostatique, l'effet entropique lié à la force motrice hydrophobe (auto-organisation de chaînes en micro domaines), il est alors possible d'obtenir un mode de condensation monomoléculaire avec des entités cationiques moins chargées (ex. cas du CTAB utilisé à une concentration inférieure à sa cac).⁴¹ Afin de limiter la réversibilité du système, une stratégie basée sur l'oligomérisation de l'agent compactant a été employée avec succès par l'équipe de J.P. Behr,⁴² puis reprise par notre équipe.³² Cette stratégie exploite l'auto-organisation d'un amphiphile cationique (utilisé sous sa cac) sur l'ADN (effet matrice), suivie de son oligomérisation pour déplacer l'équilibre vers la forme nanodispersée (cf. **Figure 10**). Plus l'amphiphile cationique présente une cac élevée, plus la différence entre les cac monomère/oligomère est grande, et plus ce mécanisme est favorisé.

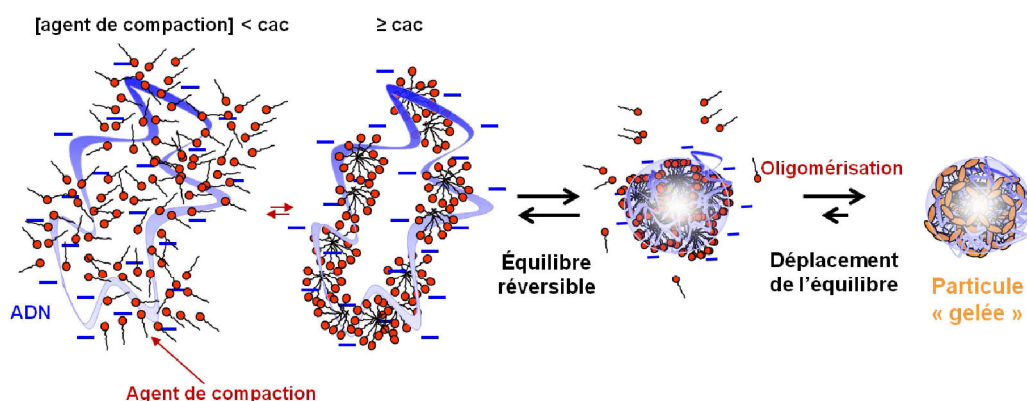


Figure 10 : Schéma de condensation quasi-monomoléculaire de l'ADN contrôlée par la micellisation puis l'oligomérisation d'un amphiphile cationique, modifié d'après⁴²

Nous avons ainsi repris ce concept pour l'adapter à trois types d'agent de compaction de l'ADN :

- (i) un amphiphile monocationique polymérisable basé sur un motif 1,2-dithiolane,
- (ii) un amphiphile monocationique basé sur un motif cystéine,
- (iii) et un amphiphile polycationique basé sur un oligomère de l'arginine (R_8).

IV.1 SYSTEME BASE SUR DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE

La stratégie envisagée ici consiste à formuler des complexes d'ADN en deux étapes (**Figure 11**), suivant un processus qui combine interactions électrostatiques et polymérisation du motif 1,2-dithiolane porté par un résidu lipoylé :

- **Etape 1** : L'ADN est condensé par un amphiphile cationique et polymérisable pour conduire à une population monodisperse de NPs cationiques de petites tailles. L'ouverture du cycle 1,2-dithiolane peut être initiée en conditions douces par des petites quantités de thiols libres^{43, 44} ou par la chaleur.^{45, 46} La condensation intermoléculaire forme alors un polymère linéaire à ponts disulfure.
- **Etape 2** : La surface des NPs est décorée avec un conjugué pégylé polyanionique et polymérisable contenant le même motif 1,2-dithiolane et des résidus aspartate. Une fonctionnalisation de surface par réduction de la charge (interactions électrostatiques entre NPs cationiques et composés anioniques) a déjà été décrite.^{47, 48} L'extrémité du PEG (5 kDa) pourra être dotée de dimères de DLC8-AS.

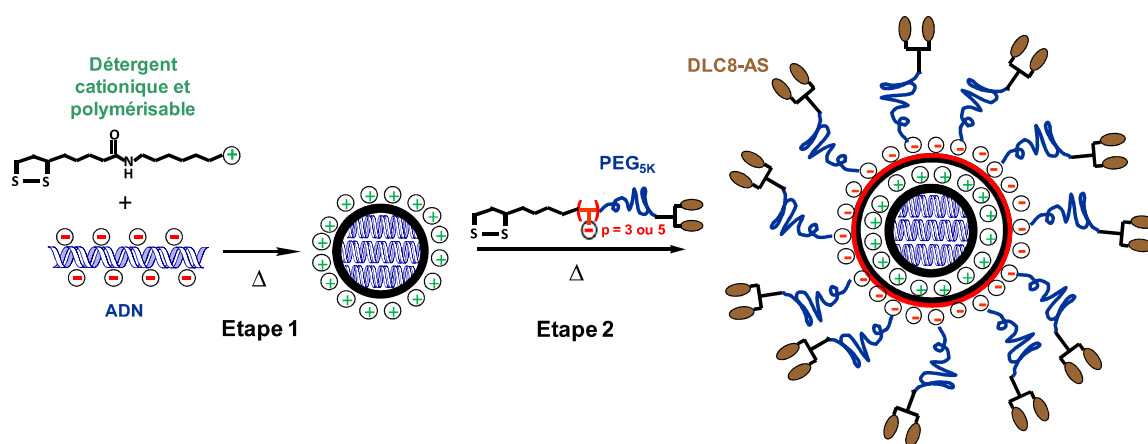


Figure 11 : Formulation de NPs d'ADN basées sur des dérivés du 1,2-dithiolane fonctionnalisées par des dimères de DLC8-AS

L'utilisation du motif 1,2-dithiolane présente différents avantages :

- (i) Le monomère est plus stable si l'on compare à des thiols tels que la cystéine qui sont particulièrement enclin à la dimérisation. D'autre part, le résidu lipoylé ne nécessite pas d'étape de protection/déprotection sélective comme dans le cas des thiols.
- (ii) L'oligomérisation du motif devrait conduire à de plus hauts degrés de polymérisation ce qui devrait limiter la réversibilité du système, tout en autorisant une certaine biodégradabilité par la présence de ponts disulfure. Notons d'ailleurs que des lipides dérivés de l'acide lipoïque ont déjà été rapportés pour la délivrance d'ADN sous contrôle rédox.⁴⁹

(iii) L'effet matrice provoqué par les interactions électrostatiques entre les amphiphiles cationiques et les conjugués pegylés anioniques, ainsi que l'oligomérisation des motifs 1,2-dithiolane pourraient agir en synergie et donner des taux de fonctionnalisation efficaces. Cette condition est, comme nous l'avons vu suite aux travaux de l'équipe, fondamentale dans le cadre du ciblage des chaînes légères LC8 de la dynéine. Finalement, l'obtention de ces NPs, dont la charge est diminuée par effet stérique (pegylation), devrait limiter les interactions non spécifiques avec les constituants biologiques et améliorer la biodisponibilité des formulations, si tant est que l'internalisation ne soit pas trop fortement diminuée. Tous ces facteurs contribuent à la formulation de systèmes plus complexes ou virus synthétiques.

Dans le chapitre II, nous exposerons la synthèse des composés utilisés dans cette stratégie, la formulation et la caractérisation des NPs d'ADN obtenues, ainsi que les études sur cellules *in vitro*.

VI.2 SYSTEME BASE SUR DES DERIVES CYSTEINE

L'équipe a, par le passé, développé des amphiphiles cationiques perfluoroalkylés et dimérisables basés sur la cystéine comme agents de condensation de l'ADN.³² Les NPs résultantes ont ensuite été fonctionnalisées d'une part avec des conjugués dimérisables et pegylés d'acide folique,³³ et d'autre part avec une ancre hydrophobe pegylée et perfluoroalkylée dotée d'un ligand DLC8-AS. Comme nous l'avons déjà vu succinctement (cf. **paragraphe III.2**), cette dernière stratégie n'a pas permis une accumulation périnucléaire des NPs d'ADN fonctionnalisées (résultats non publiés). Ce problème a été attribué à un trop faible taux de fonctionnalisation par les séquences DLC8-AS. De ce fait, la deuxième approche envisagée ici consiste à reprendre ce système et à le modifier pour tenter d'améliorer la fonctionnalisation (augmentation des niveaux d'oligomérisation). Le protocole de formulation est donné dans la figure ci-après (**Figure 12**), et consiste à utiliser de façon conjointe :

- un amphiphile monocationique et perfluoroalkylé dimérisable basé sur un résidu cystéine,
- un amphiphile non cationique et perfluoroalkylé, basé sur deux résidus cystéine et conjugué à un dimère de PEG_{1,6K}-DLC8-AS (BS69) à son extrémité.

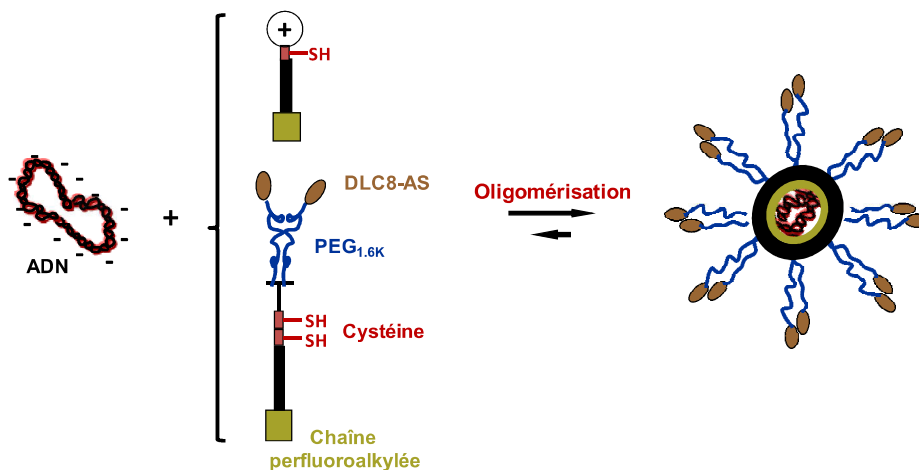


Figure 12 : Fonctionnalisation de NPs d'ADN basées sur des résidus cystéine par des dimères de DLC8-AS

Contrairement à la stratégie développée préalablement, le conjugué pegylé comporte ici un motif bis-cystéine. Ceci devrait permettre d'améliorer le taux de fonctionnalisation par le biais de l'oligomérisation de la fonction thiol des résidus cystéine. Nous avons également choisi de remplacer l'espaceur PEG 5 kDa par un PEG 1,6 kDa pour plusieurs raisons :

- (i) le PEG_{1,6K} est monodisperse donc plus facile à manipuler,
- (ii) il est aussi plus facile à caractériser par HRMS notamment, et
- (iii) une stratégie *in vitro* ne requiert pas l'emploi de l'arsenal lourd constitué par un long PEG.

Les résultats obtenus quant à la synthèse des composés, à la caractérisation physico-chimique des formulations ainsi qu'aux expériences sur cellules *in vitro* seront exposés dans le chapitre III.

VI.3 SYSTEME BASE SUR DES DERIVES OCTAARGININE

La dernière approche envisagée dans ce projet de thèse consiste à utiliser des amphiphiles peptidiques de type polyarginine. L'utilisation de peptides cationiques pour le transfert de gènes présente plusieurs avantages par rapport aux systèmes polymériques ou lipidiques classiques. Les systèmes peptidiques sont en effet biocompatibles et biodégradables, ce qui diminue le caractère toxique ou immunogène du vecteur. Par ailleurs, les peptides sont aisément produits et caractérisés, notamment grâce au développement de la synthèse en phase solide. Ainsi, des séquences peptidiques bien particulières sont fréquemment utilisées comme outils pour transgresser efficacement les barrières du transfert de gènes.⁵⁰ Citons par exemple les peptides pénétrants (CPPs, cf. **partie I, paragraphe IV.2**) riches en résidus arginine tels que Tat-(48-60) ou Rev-(34-50) du VIH-1 qui sont capables de traverser la membrane plasmique.⁵¹

Les autres avantages liés à l'utilisation de séquences homopeptidiques telles que les polylysines ou, mieux les polyarginines, concernent plus particulièrement :

La condensation de l'ADN

Des homopeptides cationiques de hauts poids moléculaires (> 5kDa) tels que les polyarginines et les polylysines ont largement été utilisés pour leur capacité à condenser efficacement l'ADN. Néanmoins, des séquences oligopeptidiques plus courtes sont généralement moins toxiques et moins immunogènes. C'est par exemple le cas des oligolysines par rapport aux poly-L-lysine (PLL).⁵² Dix-huit résidus lysine sont *a priori* nécessaires pour obtenir un transfert de gènes efficace.⁵³ Cependant, non seulement le nombre d'acides aminés mais aussi leur nature constituent les paramètres importants pour le développement de vecteurs peptidiques de transfert de gènes. Ainsi, Mann et *al* ont montré que les oligolysines étaient moins aptes à transfecter des cellules *in vitro* que les oligoarginines.⁵⁴ L'arginine serait en effet plus efficace que la lysine notamment pour l'étape de décomplexation ADN-vecteur. En effet, même dans le cas d'oligolysines internalisées efficacement dans les cellules (cas de K₁₆), le niveau de transfection reste faible.

L'entrée dans la cellule

Les oligolysines et les oligoarginines ont aussi été utilisées comme agents de pénétration de la membrane plasmique. D'après les études réalisées par Mitchell et *al*, les oligoarginines (R_7) auraient de meilleures propriétés CPP que les oligohistidines (H_7) et que les oligolysines (K_7).⁵⁵ Pour autant, le mécanisme d'entrée dans la cellule des homopolymères d'arginine n'est pas encore établi. Il pourrait faire intervenir à la fois les charges cationiques pour l'interaction avec les protéines membranaires, et les groupements guanidinium.^{56, 57} En ce qui concerne la longueur de la chaîne peptidique, Wender et *al* ont observé qu'un 9-mer d'arginine rentrait plus efficacement dans les cellules qu'un motif plus court, et que 6 résidus minimum étaient nécessaires pour l'internalisation.⁵⁸ Plus remarquablement, la transfection a été améliorée en attachant une entité hydrophobe sur la chaîne homoarginine. Ainsi, la stéarylation *N*-terminale de l'oligoarginine R_8 a contribué à une nette amélioration de l'efficacité de transfection, en atteignant des résultats similaires à ceux obtenus avec la Lipofectamine de référence.⁵⁹ Dans le cas de ces vecteurs de type stéaryl-oligo R_n , l'octaarginine semble être le meilleur candidat. Dans une autre étude, Lehto et *al* ont préparé un conjugué stéaryl-(*R*-acide aminohexanoïque- R)₄ qui a montré des niveaux de transfection plus hauts que son homologue (*R*-acide aminohexanoïque- R)₄ non modifié, et ce sur de nombreux types cellulaires.⁶⁰ Cette augmentation des niveaux de transfection avec les vecteurs portant des groupements stéaryles a été attribuée à une amélioration de l'échappement endosomal par les chaînes grasses. L'utilisation de lipides cationiques peptidiques comme agents de transfert de gènes a aussi été rapportée.^{61, 62}

Dans ce contexte, le protocole de formulation est donné ci-après (**Figure 13**), et consiste à utiliser sur l'ADN de façon conjointe :

- un amphiphile polycationique et perfluoroalkylé comportant huit résidus arginine,
- un amphiphile polycationique et perfluoroalkylé à huit résidus arginine conjugué à un dimère de PEG_{1,6K}-DLC8-AS (BS69) à son extrémité.

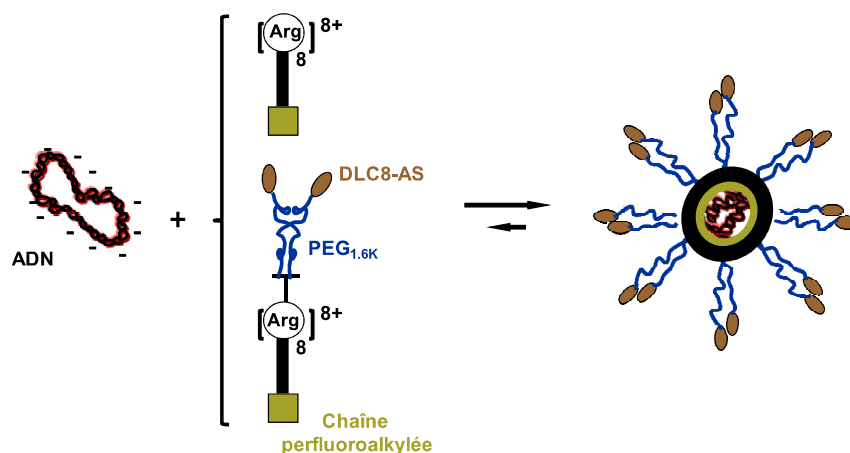


Figure 13 : Fonctionnalisation de NPs d'ADN basées sur des résidus arginine par des dimères de DLC8-AS

L'octaarginine devrait donc permettre une forte interaction avec les groupements phosphate de l'ADN, et pourrait faciliter l'étape de pénétration de la membrane plasmique grâce à ses propriétés CPP. Les huit charges positives permettent une grande modulation en termes de formulation, c'est-à-dire de condenser l'ADN de façon monomoléculaire ou conventionnelle en fonction des conditions opératoires (concentration). Enfin, le couplage d'une entité hydrophobe et lipophobe telle qu'une chaîne perfluoroalkylée sur la partie octaarginine pourrait contribuer à diminuer les interactions non spécifiques et/ou permettre d'améliorer l'échappement endosomal des nanovecteurs par un effet lysomotropique.

Dans le chapitre IV, nous verrons la synthèse des composés utilisés dans cette stratégie, la formulation et la caractérisation des NPs d'ADN obtenues, ainsi que les études sur cellules *in vitro*.

CHAPITRE II : FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES BASEES SUR DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE

Le travail décrit dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication intitulée « *Formulation of Highly Functionalizable DNA Nanoparticles Based on 1,2-dithiolane Derivatives* » dans le journal ChemBioChem (**Annexe 4**).

La stratégie précédemment décrite (**chapitre I, paragraphe VI.1**) consiste à formuler des NPs d'ADN fonctionnalisées par des séquences DLC8-AS dimériques, suivant un processus en deux étapes combinant interactions électrostatiques et polymérisation du motif 1,2-dithiolane. Des études préliminaires, sur un modèle simplifié, nous ont paru indispensables avant d'envisager la fonctionnalisation des extrémités pegylées par le peptide BS69 de liaison à LC8. Le travail a donc été découpé de la façon suivante :

- (i) synthèse des amphiphiles cationiques polymérisables et vérification de leur aptitude à donner des NPs d'ADN de petites tailles et à former des oligomères par le biais du motif 1,2-dithiolane,
- (ii) synthèse et évaluation d'un modèle simplifié de conjugués polyanioniques polymérisables et pegylés pour fonctionnaliser la surface des NPs cationiques obtenues (sans DLC8-AS et sous forme monomérique au lieu de dimère),
- (iii) formulation du modèle simplifié de virus artificiel, en deux étapes (**Figure 14**) et évaluation de l'efficacité de transfection.

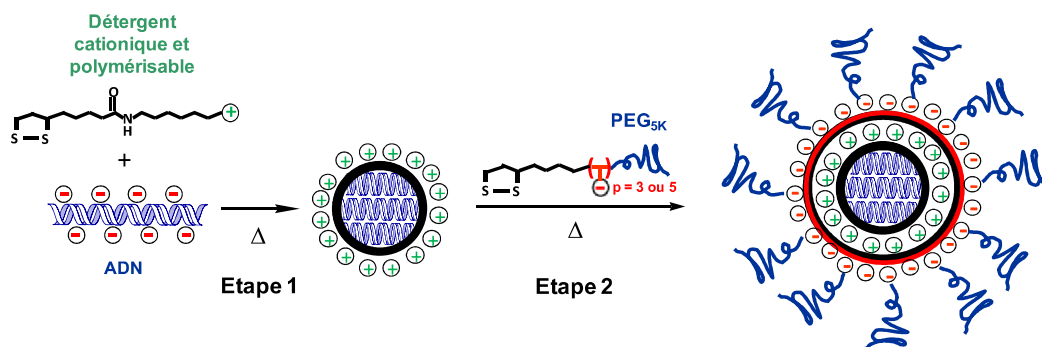
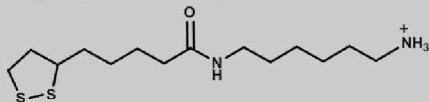
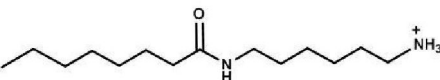
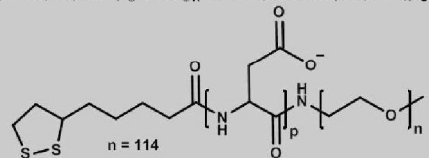
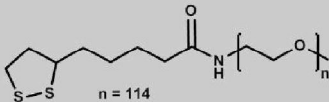
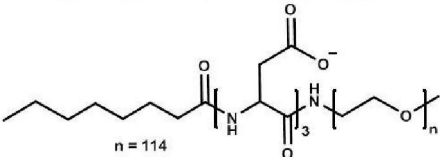
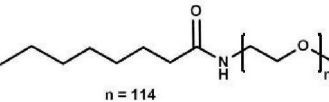


Figure 14 : Formulation de NPs d'ADN hautement fonctionnalisées basées sur des dérivés du 1,2-dithiolane

I. DESIGN DES MOLECULES A BASE DE 1,2-DITHIOLANE ET DES CONTROLES

La structure des composés utilisés pour la condensation de l'ADN (**Etape 1, Figure 14**), ainsi que pour la fonctionnalisation de surface des NPs cationiques (**Etape 2, Figure 14**) est donnée dans le **Tableau 5** ci-après.

Tableau 5 : Amphiphiles, conjugués pegylés et contrôles

	Composés chargés	Composés neutres
Détergent polymérisable	Lip-C ₆ -NH ₃ ⁺ (cationique) 3a 	
Détergent non polymérisable	Oct-C ₆ -NH ₃ ⁺ (cationique) 3b 	
Conjugués PEG polymérisables	(p = 3) Lip-Asp ₃ -PEG _{5K} -OMe (anionique) 9a(p₃) (p = 5) Lip-Asp ₅ -PEG _{5K} -OMe (anionique) 9a(p₅) 	Lip-PEG _{5K} -OMe 4a 
Conjugués PEG non polymérisables	Oct-Asp ₃ -PEG _{5K} -OMe (anionique) 9b(p₃) 	Oct-PEG _{5K} -OMe 4b 

L'amphiphile cationique polymérisable, Lip-C₆-NH₃⁺ **3a**, est un lipoylamide qui provient de la condensation de l'acide lipoïque avec la 1,6-hexanediamine. Il est important de noter que le lipoamide, composé de structure très similaire (amide de l'acide lipoïque), est efficacement réduit dans les cellules de mammifères par les enzymes lipoamide déshydrogénase et thiorédoxine réductase NADPH-dépendantes.⁶³ L'utilisation de composés semblables devrait permettre la libération intracellulaire de l'ADN complexé par la réduction des ponts disulfure. En ce qui concerne les conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables, Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** et Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**, ils sont également dérivés de l'acide lipoïque et portent un tri- ou penta-aspartate, respectivement. Le pKa des chaînes latérales de l'acide aspartique étant de 3,9, ce peptide est totalement déprotonné en conditions physiologiques et porte 3 ou 5 charges négatives (composé **9a(p₃)** ou **9a(p₅)** respectivement). La chaîne d'acides aminés est suivie par un résidu pegylé de haut poids moléculaire (PEG 5 kDa) terminé par un groupement méthoxy, pour une preuve de concept. En cas de validation, l'objectif est bien entendu, de remplacer le groupement -OMe par des séquences DLC8-AS dimériques pour un ciblage de la dynéine. Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons préparé un certain nombre de témoins ou contrôles :

- un amphiphile cationique non polymérisable Oct-C₆-NH₃⁺ **3b** qui possède un squelette carboné homologue à celui du composé **3a** mais sans motif polymérisable,
- un conjugué pegylé Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)** qui porte trois charges négatives à pH physiologique mais pas le motif polymérisable,
- un conjugué pegylé Lip-PEG_{5K}-OMe **4a** qui possède le motif polymérisable mais pas les charges anioniques,
- un conjugué pegylé Oct-PEG_{5K}-OMe **4b** qui n'est ni anionique, ni polymérisable.

II. SYNTHÈSE DES AMPHIPHILES CATIONIQUES ET DES CONJUGUÉS PEGYLES

La synthèse des amphiphiles cationiques Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** et Oct-C₆-NH₃⁺ **3b**, et des conjugués pegylés neutres Lip-PEG_{5K}-OMe **4a** et Oct-PEG_{5K}-OMe **4b**, a été réalisée suivant un schéma réactionnel simple en trois et deux étapes, respectivement (**Schéma 1**).

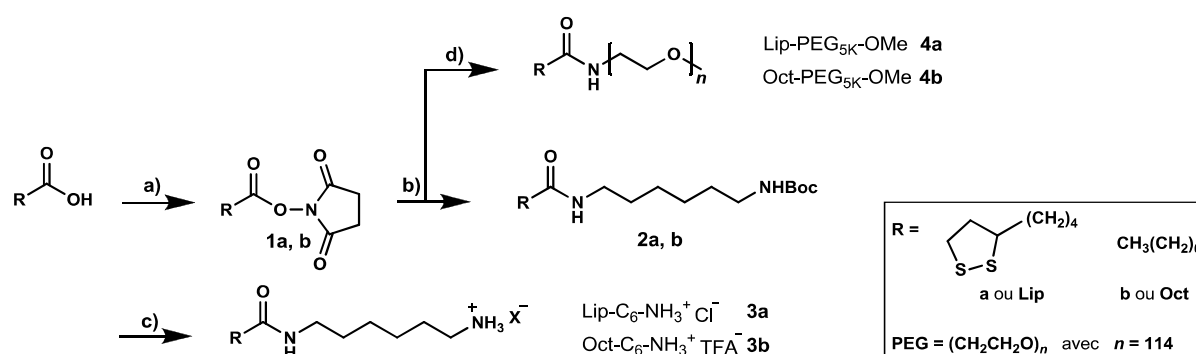


Schéma 1 : Synthèse des amphiphiles cationiques et des conjugués pegylés neutres

a) HOSu (1,5 eq), DCC (1,3 eq), CH₂Cl₂ ; b) H₂N(CH₂)₆NHBoc (1,2 eq), DIPEA (1,5), CH₂Cl₂ ; c) MeOH, HCl (15 eq) (pour Lip-C₆-NH₃⁺) et TFA/CH₂Cl₂ 1:1 (pour Oct-C₆-NH₃⁺) ; d) H₂N-PEG_{5K}-OMe (0,7 eq), DIPEA, CH₂Cl₂

La première étape consiste à activer l'acide lipique ou l'acide octanoïque au moyen du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et du *N*-hydroxysuccinimide (HOSu) pour former les esters *N*-hydroxysuccinimide **1a,b** correspondants avec de bons rendements. Ces esters activés sont ensuite conjugués à la *N*-Boc-1,6-hexanediamine (H₂NC₆NHBoc) pour donner les amides **2a,b** avec 87% de rendement. Finalement, la fonction *N*-terminale des composés est régénérée en milieu acide pour former les amphiphiles **3a** et **3b** avec 64% et 72% de rendement, respectivement. En ce qui concerne les conjugués pegylés neutres Lip-PEG_{5K}-OMe **4a** et Oct-PEG_{5K}-OMe **4b**, ils ont été obtenus par simple couplage de la fonction amine du PEG hétérobifonctionnel H₂N-PEG_{5K}-OMe sur les acides activés **1a** et **1b** (utilisés en excès pour favoriser la consommation du PEG).

Les conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables (Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** et Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**) ou le non polymérisable (Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)**), ont été synthétisés suivant une procédure alliant phase solide et phase liquide (**Schéma 2**).

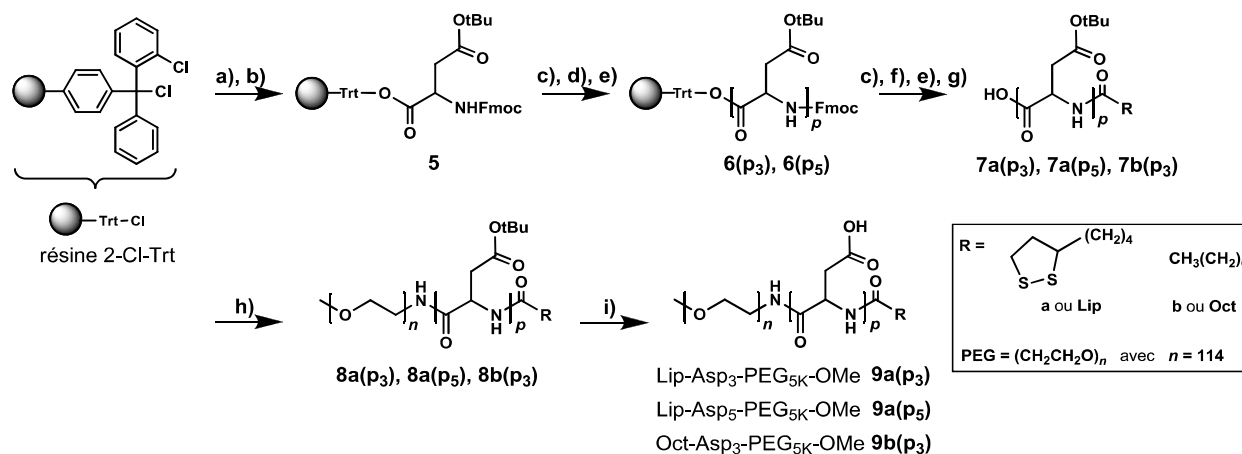


Schéma 2 : Synthèse des conjugués pegylés polyanioniques

a) **couplage** : Fmoc-Asp(OtBu)-OH (2 eq vs. résine), DIPEA (3 eq), DMF (2 cycles); b) **capping** : DMF/MeOH 65:10; c) **déprotection** : DMF/pipéridine 4 : 1 (4 cycles); d) **couplage** : Fmoc-Asp(OtBu)-OH (2 eq), HOBt (3 eq), DIC (2,4 eq), DMF (2 cycles); e) **capping** : Ac₂O (0,5 M), DIPEA (20 eq), DMF ; répéter les étapes c, d et e (déprotection, couplage, *capping*) 2x pour Asp₃ et 4x pour Asp₅ ; f) **couplage** : **1a** ou **1b** (2 eq), DIPEA (2 eq), DMAP (0,1 eq), CH₂Cl₂ (2 cycles); g) CH₂Cl₂/TFE/CH₃CO₂H 4:1:1; h) **7a,b** (1,5 eq), HOBt (2,5 eq) et DIC (2 eq), CH₂Cl₂ puis DIPEA, H₂N-PEG_{5K}-OMe (1 eq); i) TFA/CH₂Cl₂ 1:1

Pour la partie synthèse réalisée sur support solide, nous avons suivi une stratégie Fmoc classique, en utilisant des résidus aspartiques protégés Fmoc au niveau de leur extrémité *N*-terminale. Pour satisfaire des conditions orthogonales, leur chaîne latérale est protégée sous la forme d'un ester *tert*-butylique. Nous avons utilisé pour support solide la résine 2-chlorotrityle (2-Cl-Trt), qui permet un clivage final en conditions acides douces, préservant les protections acido-labiles des chaînes latérales des acides aminés. La première étape consiste alors à coupler le premier résidu d'acide aspartique diprotégé (*N*-Fmoc et γ -OtBu) sur la résine, *via* son sel de carboxylate généré en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) (**5**). Les fonctions réactives résiduelles de la résine sont ensuite neutralisées au moyen de méthanol. Le polypeptide, Asp₃ ou Asp₅, est par la suite allongé suivant une procédure classique. En effet, dans une première étape, la fonction amine terminale *N*-Fmoc de la chaîne en croissance est déprotégée au moyen d'une solution de pipéridine dans le diméthylformamide (DMF). L'amine ainsi générée est couplée au deuxième résidu d'acide aspartique Fmoc/OtBu après activation de sa fonction acide carboxylique grâce à un mélange diisopropylcarbodiimide (DIC) et hydroxybenzotriazole (HOBt). Cette étape de couplage, réalisée deux fois successivement, est suivie d'une étape de *capping* (anhydride acétique/DIPEA) ayant pour but d'acétyler les amines qui n'auraient pas réagi. Cet enchaînement de cycles déprotection/couplage et *capping* est répété deux fois pour Asp₃ et quatre fois pour Asp₅, pour conduire aux composés **6(p₃)** et **6(p₅)**. La dernière étape sur support solide consiste à condenser les acides activés lipoyles et octanoyles **1a,b** sur l'extrémité *N*-terminale libre du polypeptide. Le clivage de la résine à l'aide d'une solution de trifluoroéthanol/acide acétique dans le dichlorométhane permet finalement d'obtenir les composés **7a(p₃)**, **7a(p₅)** et **7b(p₃)**.

La deuxième partie de la synthèse a été réalisée suivant un protocole classique en phase liquide. Les composés **7a(p₃)**, **7a(p₅)** et **7b(p₃)** sont tout d'abord activés au moyen de DCC/HOSu, puis couplés sur

la fonction amine du PEG H₂N-PEG_{5K}-OMe pour conduire à **8a(p₃)**, **8a(p₅)** et **8b(p₃)**. La dernière étape de déprotection des chaînes latérales des résidus aspartiques en milieu acide trifluoroacétique conduit aux conjugués pegylés polycarboxyliques attendus Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)**, Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** et Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)**, avec un rendement global de 52, 65 et 61%, respectivement.

Il est à noter que toutes les étapes de couplage/déprotection réalisées sur support solide ont fait l'objet d'un suivi qualitatif et/ou quantitatif permettant d'optimiser le protocole. Ainsi, pour les étapes de couplage :

- le test colorimétrique de Kaiser⁶⁴ (qualitatif), effectué après chaque cycle de couplage d'acides aminés sur la résine, nous informe de l'éventuelle présence de fonctions amines libres résiduelles,
- après chaque étape de couplage (généralement deux cycles successifs), une petite portion du composé en élévation sur la résine est clivée et une analyse par spectrométrie de masse permet de confirmer la qualité du couplage.

Pour les étapes de déprotection :

- le dosage UV (quantitatif) à 290 nm de l'adduit Fmoc-pipéridine généré lors de la déprotection des extrémités *N*-terminales nous renseigne précisément sur le taux de chargement de la résine.

A titre d'exemple, nous donnons ci-dessous (**Figure 15**) le spectre de masse (ESI-HRMS) du composé final Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**.

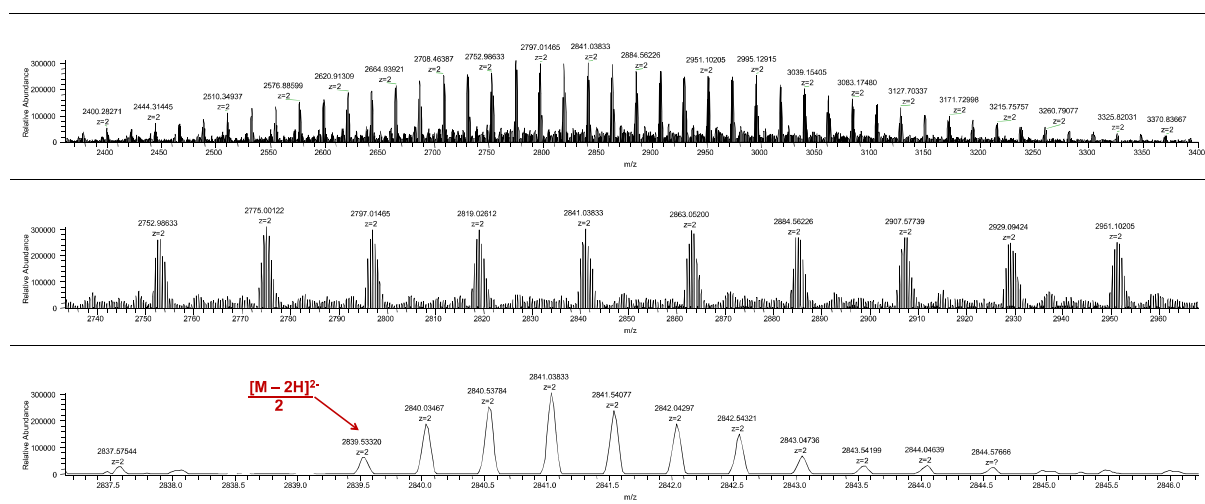


Figure 15 : Spectre HRMS en mode négatif du conjugué Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe (FTMS-ESI Orbitrap)

Le polyéthylène glycol 5 kDa étant polydisperse, le premier spectre donne l'enveloppe globale recouvrant les massifs isotopiques des molécules dichargées ayant des longueurs de chaînes *n* différentes. Le deuxième spectre est un agrandissement sur la zone des molécules les plus abondantes dans l'échantillon. Le dernier spectre est le massif isotopique du composé **9a(p₅)** deux fois chargé (-2H⁺) avec *n* = 111 (M = 5681,1191).

III. FORMULATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES D'ADN ISSUS DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE

Nous avons souhaité dans un premier temps étudier les caractéristiques physiques des complexes d'ADN formulés à partir des dérivés du 1,2-dithiolane. Il s'agit de déterminer leur intégrité, leur taille et leur potentiel zêta afin d'évaluer :

- (i) la capacité de l'amphiphile cationique et polymérisable Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** à condenser l'ADN pour former une population de particules stables, monodisperses et de petites tailles,
- (ii) la capacité des conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** et Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** à fonctionnaliser les particules cationiques obtenues.

Avant de présenter les résultats, il semble indispensable de rappeler très brièvement la cartographie du plasmide ainsi que les méthodes générales de caractérisation des complexes d'ADN, que nous avons utilisées dans notre cas.

III.1 PLASMIDE UTILISE

Le plasmide utilisé comme outil de travail est le pTG11236 (5739 pb), dont la cartographie est donnée dans la **Figure 16** (explication des différentes composantes d'un plasmide **partie I, paragraphe IV.3.4**). Il comporte une cassette d'expression constituée notamment du gène rapporteur de la luciférase, et du promoteur du cytomégalo virus (CMV). Ce promoteur viral permet une forte expression dans tous types de tissus. La séquence plasmidique est aussi dotée d'un gène de résistance à la kanamycine, qui permet de ne sélectionner que les bactéries ayant effectivement produit le plasmide.

Ce plasmide, initialement conçu par la société Transgène (Strasbourg), est produit au laboratoire en trois grandes étapes :

- (i) une étape d'amplification effectuée par culture d'*Escherichia Coli* sous pression de kanamycine,
- (ii) une étape d'extraction/purification réalisée par lyse alcaline des bactéries, suivie d'une colonne échangeuse d'anions (« *Qiagen Giga kit endotoxin free* »),
- (iii) une étape de contrôle de la pureté du plasmide par dosage UV (260 nm), et par électrophorèse sur gel d'agarose qui permet d'identifier les différents isomères présents dans le lot obtenu (ADN linéaire, ADN plasmidique enroulé et/ou « super-enroulé »).

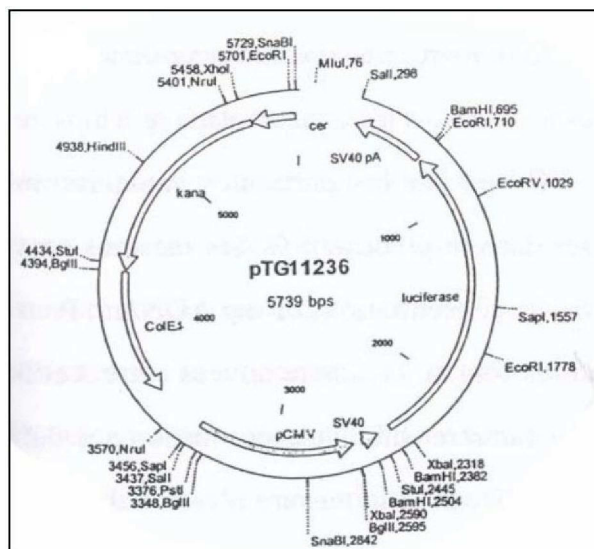


Figure 16 : Cartographie du plasmide pTG11236

III.2 METHODES GENERALES DE CARACTERISATION DES COMPLEXES D'ADN

Communément, les caractéristiques physiques des complexes d'ADN sont déterminées grâce à quatre grandes méthodes :

- mesure de l'état de compaction et de l'accessibilité de l'ADN par retard sur gel d'électrophorèse imprégné de bromure d'éthidium (BET),
- mesure de la taille (diamètre hydrodynamique) par diffusion quasi-élastique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS),
- détermination du potentiel zêta (ζ) par mesure de la mobilité électrophorétique des particules,
- mesure de la taille et analyse de la morphologie des complexes par microscopie électronique en transmission (MET).

Le principe des trois dernières techniques est succinctement décrit en **Annexe 1** et **2**.

III.3 FORMULATION DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE 1,2-DITHIOLANE

Les complexes d'ADN sont préparés au rapport de charge N/P souhaité (avec N : nombre d'amines protonables portées par l'agent de compaction ; P : nombre de groupements phosphate du plasmide) par addition d'une solution stock d'amphiphile cationique dans l'éthanol, à une solution d'ADN plasmidique dans l'HEPES (20 mM, pH = 7,4). La suspension est agitée à température ambiante pendant 1 h, puis à 50°C sur la nuit. Pour les particules fonctionnalisées, les conjugués pegylés sont ajoutés ensuite (solutions stock dans l'HEPES), puis les formulations sont à nouveau agitées pendant 2 h à 50°C. Les protocoles sont décrits dans la partie expérimentale (**partie III, paragraphe IV**).

III.4 CONDENSATION DE L'ADN EN NANOPARTICULES QUASI-MONOMOLECULAIRES

III.4.1 EVALUATION DE L'ETAT DE COMPACTION DE L'ADN

D'après la littérature, la polymérisation de résidus 1,2-dithiolane et 1,2-dithiane peut être initiée soit par induction chimique (ajout d'une quantité catalytique d'agent réducteur)^{43, 44} soit sous l'action de photons,⁶⁵ soit sous l'action de la température proche des points de fusion des monomères.^{46, 66} Dans notre cas, l'ADN pourrait alors agir comme matrice pour concentrer les résidus lipoyl et permettre une polymérisation induite par chauffage. La capacité de l'amphiphile Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** à compacter l'ADN par polymérisation thermique a été évaluée sur gel d'agarose, en comparaison avec son homologue non polymérisable Oct-C₆-NH₃⁺ **3b**. Les deux formulations ont été préparées à N/P 10, c'est-à-dire en large excès de détergent. Une fois l'équilibre établi (après 1 h), la polymérisation a été induite en chauffant la suspension à 50°C sur la nuit. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 17** ci-dessous.

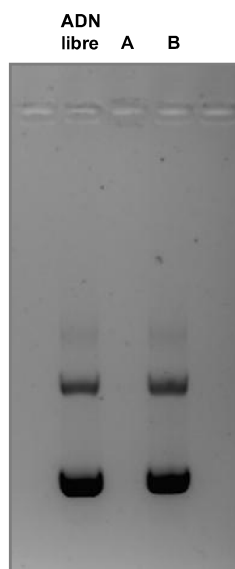


Figure 17 : Gel d'agarose des complexes ADN/amphiphile formulés avec Lip-C₆-NH₃⁺ (**A**), ou avec Oct-C₆-NH₃⁺ (**B**)

De façon très claire, le gel montre que seul l'amphiphile polymérisable **3a** est en mesure de condenser efficacement l'ADN, qui n'est alors plus accessible au BET. En effet, l'ADN reste libre dans le cas de l'amphiphile non polymérisable **3b**. Ainsi, le groupement 1,2-dithiolane semble contribuer à améliorer la stabilité des complexes. Cette stabilité pourrait provenir de la polymérisation des résidus 1,2-dithiolane en polymères linéaires, qui se produit une fois les interactions ioniques avec l'ADN formées. Ainsi, l'ADN jouerait un rôle de matrice pour les amphiphiles dont la proximité favoriserait la polymérisation.

Bien que les conditions de concentration au rapport de charge N/P 10 sortent du contexte de condensation monomoléculaire de l'ADN, il est remarquable de noter que les mesures de tailles effectuées par DLS et les images de TEM (cf. **paragraphes III.5.2 et III.5.3**), montrent que l'amphiphile Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** conduit à une population monodisperse de nanoparticules de tailles centrées autour de 100 nm. Ainsi, nous qualifions notre système de quasi-monomoléculaire en ADN.

III.4.2 ETUDE DU PROCESSUS DE POLYMERISATION DU MOTIF 1,2-DITHIOLANE

III.4.2.1 EXPERIENCE D'EXCLUSION DU BROMURE D'ETHIDIUM

Afin de mettre en évidence le processus de polymérisation du motif 1,2-dithiolane sur l'ADN, nous avons réalisé une expérience de spectrofluorimétrie basée sur l'exclusion du bromure d'éthidium (BET). Ainsi, l'ADN plasmidique a tout d'abord été marqué avec du BET, à raison d'une molécule pour vingt-cinq paires de bases. Les complexes ont ensuite été formulés avec l'amphiphile Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** (N/P 0,1-8), en induisant ou non la polymérisation (avec ou sans chauffage à 50°C sur la nuit), ou en présence d'un large excès de dithiothréitol (DTT, 10 mM) pour assurer une totale réduction des motifs 1,2-dithiolane. Le DTT ou réactif de Cleland⁶⁷ est un agent réducteur fréquemment utilisé en biochimie comme antioxydant pour assurer la stabilité des protéines. Dans le cadre de cette étude, des complexes d'ADN à base de PEI branché (25 kDa) ont été pris comme contrôles. Les résultats sont donnés ci-après (**Figure 18**) en intensité relative de fluorescence [%], c'est-à-dire en pourcentage de BET intercalé à l'ADN après addition de l'agent de condensation, en fonction du rapport N/P. La diminution de l'intensité de fluorescence (600 nm), représentant l'interaction du détergent avec l'ADN concomitante à la dissociation du BET, a été mesurée après excitation du BET à 520 nm, puis transformée en intensité relative de fluorescence (IRF) à partir de la formule suivante :

$$IRF_{(x)} = \frac{F_{(x)} - F_{(0)}}{F_{ADN} - F_{(0)}} \times 100 \quad \text{Equation (1)}$$

Avec $IRF_{(x)}$: l'intensité relative de fluorescence du complexe x au rapport N/P donné,

$F_{(x)}$: la fluorescence du complexe x en présence de BET dans l'HEPES,

$F_{(0)}$: la fluorescence du BET seul dans l'HEPES,

F_{ADN} : la fluorescence de l'ADN nu en présence de BET dans l'HEPES.

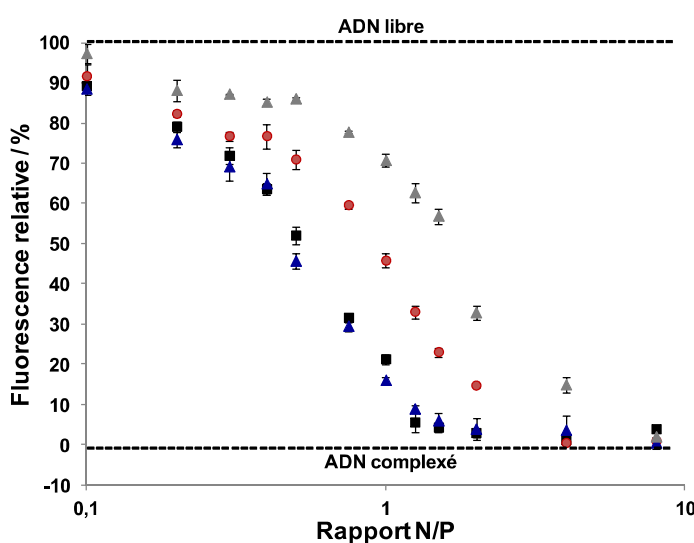


Figure 18 : Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium à 25°C pour les complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ fraîchement préparés (■), après une nuit à 50°C (▲), ou en présence de 10 mM de DTT (▲) ; **contrôle** : complexes ADN/PEIb (●)

Les courbes de dosage obtenues nous permettent d'estimer les constantes d'association apparentes (K^*_A) des différents agents de compaction. Ainsi, nous avons utilisé l'équation simplifiée :⁴⁹

$$K^*_A = \frac{1}{C^* - 0,5 \times C_{ADN}} \quad \text{Equation (2)}$$

Avec C^* : la concentration du monomère cationique au point d'inflexion,

C_{ADN} : la concentration totale d'ADN.

Ainsi, nous avons $K^*_{A1} = 100 \mu\text{M}$ pour le dérivé Lip- $\text{C}_6\text{-NH}_3^+$ **3a** en conditions réductrices (DTT), $K^*_{A2} = 11 \mu\text{M}$ pour le contrôle PEI, et $K^*_{A3} = 3 \mu\text{M}$ pour le dérivé **3a** quelles que soient les conditions (avec ou sans induction de la polymérisation par chauffage à 50°C). Ces résultats montrent que des conditions réductrices permettent de diminuer fortement l'affinité de l'agent compactant **3a** pour l'ADN (~35 fois si l'on considère K^*_{A1} et K^*_{A3}). La réduction totale des motifs 1,2-dithiolane a donc un impact important sur la stabilité des complexes. Par ailleurs et de façon remarquable, les complexes ADN/**3a** sont plus stables que les polyplexes de PEI (~4 fois si l'on considère K^*_{A2} et K^*_{A3}), or les polycations sont connus pour interagir fortement avec les phosphates de l'ADN. Cependant, nous n'avons pas ici de preuve directe quant au processus de polymérisation, puisque celle-ci ne semble pas favorisée par l'étape de chauffage. En effet, les courbes obtenues pour les complexes ADN/**3a** chauffés à 50°C sur la nuit, et pour ceux fraîchement préparés sont quasi-superposables.

La condensation de l'ADN par des détergents cationiques est un phénomène connu.⁴¹ Il s'agit d'un processus hautement réversible à cause d'échanges rapides avec le milieu, qui conduit généralement à une dissociation des complexes lorsque la force ionique ou la dilution augmentent. Nous pouvons ainsi imaginer qu'un autre mécanisme entre en jeu dans le cas de l'amphiphile **3a**, qui ne reposerait pas uniquement sur des interactions de type électrostatique. L'ADN agirait comme matrice pour concentrer les lipoamides et favoriser la réaction de polymérisation en conditions douces, à partir d'une infime fraction de radicaux libres générée par la lumière.⁴²

III.4.2.2 SUIVI UV DU CHROMOPHORE 1,2-DITHIOLANE

A) MONOMERE Lip- $\text{C}_6\text{-NH}_3^+$

Pour satisfaire aux conditions de condensation monomoléculaire de l'ADN, l'amphiphile Lip- $\text{C}_6\text{-NH}_3^+$ **3a** doit se trouver sous forme cyclique et monomérique au cours des premières étapes du processus. Ainsi, pour exclure la possible polymérisation du cycle 1,2-dithiolane avant une quelconque interaction avec l'ADN, nous avons suivi l'évolution de son chromophore qui présente un signal caractéristique par UV à 333 nm en travaillant à 6 mM en détergent (**Figure 19**).

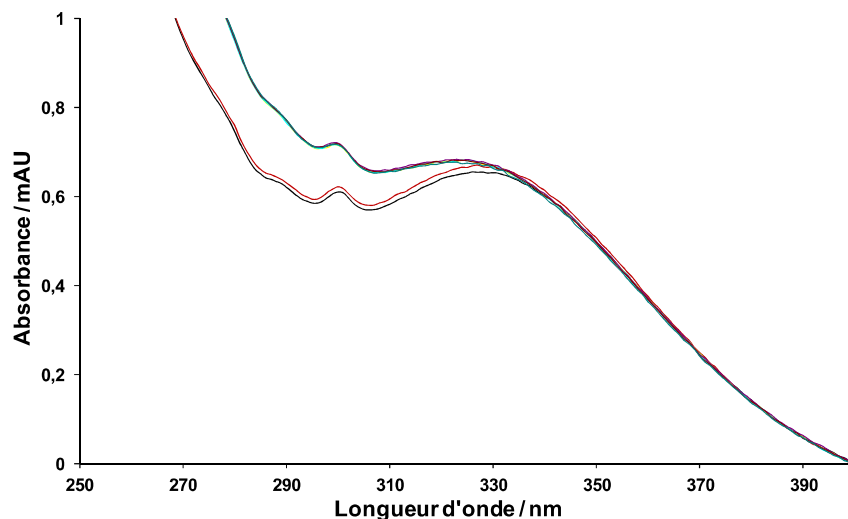


Figure 19 : Absorbance UV à 333 nm du Lip-C₆-NH₃⁺ dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4) après 0 (—), 1 (—), 2 (—), 6 (—), 12 (—) ou 24 h (—)

Les résultats obtenus montrent que le monomère **3a** est stable dans le tampon utilisé (HEPES, 20 mM, pH 7,4), sur une période de 24 h (temps requis pour l'expérience ~12 h). Toutefois, aux faibles concentrations de composés utilisées pour la formulation des complexes (à 15 µM en ADN), le signal n'a pas pu être détecté.

B) COMPLEXES ADN/LIP-C₆-NH₃⁺

Afin d'obtenir une preuve directe de la polymérisation de l'amphiphile Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** sur l'ADN, nous avons suivi la formation des complexes en UV à 333 nm. La polymérisation devrait se traduire par une diminution de la bande caractéristique du motif lipoyl. Nous avons ainsi formulé des complexes ADN/**3a** à N/P 10 (à 600 µM en ADN) puis mesuré l'absorbance à différents temps. A t₀, nous n'avons aucun signal à 333 nm. Par la suite, l'intensité de la bande caractéristique du 1,2-dithiolane augmente de façon croissante en fonction du temps, jusqu'à une valeur limite d'absorbance après une nuit. Ce résultat, inverse à celui attendu, pourrait être expliqué par une exaltation du coefficient d'extinction molaire du Lip-C₆-NH₃⁺ en interaction avec l'ADN.

N'ayant pas obtenu de preuve directe quant à la polymérisation des motifs 1,2-dithiolane, nous avons néanmoins continué aux vues des résultats obtenus lors de la compaction de l'ADN.

III.5 FONCTIONNALISATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES D'ADN

III.5.1 EVALUATION DE L'INTEGRITE DES NANOPARTICULES APRES FONCTIONNALISATION

Les virus synthétiques modèles à base de dérivés du 1,2-dithiolane ont été formulés suivant un processus en deux étapes (**Figure 14**) : formation des NPs cationiques avec un large excès de Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** (N/P 10), suivie d'une fonctionnalisation de leur surface par des dérivés pegylés polyanioniques et polymérisables. Une expérience de gel retard a été effectuée pour s'assurer que la fonctionnalisation ne nuisait pas à l'intégrité des complexes. Après formation des complexes ADN/**3a**

à N/P 10, leur surface a été décorée avec des quantités variables (1 à 10 mol%) du conjugué Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** par rapport à l'amphiphile cationique. Comme l'atteste l'absence d'ADN libre sur les bandes **1-10 mol%** du gel ci-dessous (**Figure 20**), l'addition du conjugué pegylé ne déstabilise pas les complexes d'ADN. Jusqu'à 10 mol% du composé tri-anionique polymérisable et pegylé **9a(p₃)** peut en effet être incorporé aux NPs cationiques ADN/**3a** sans perturber le système. Des résultats similaires ont été obtenus avec son homologue penta-anionique Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** (non présentés ici).

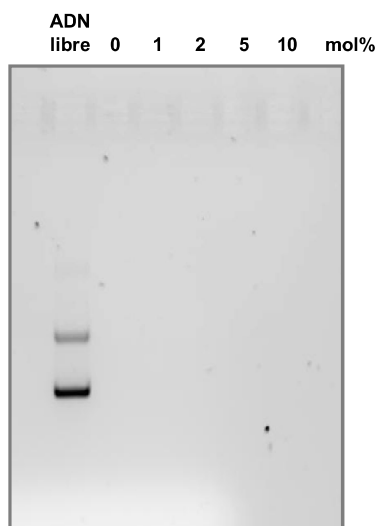


Figure 20 : Gel d'agarose des complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ fonctionnalisés avec Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe à 0, 1, 2, 5 et 10 mol% (vs détergent)

III.5.2 MESURE DE LA TAILLE ET DU POTENTIEL ZETA

Le processus de fonctionnalisation a ensuite été évalué en mesurant l'évolution de la taille (DLS) et du potentiel zêta des complexes cationiques ADN/**3a** à N/P 10, lors de l'ajout des conjugués Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** ou Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** à 5 et 10 mol%. La même expérience a été réalisée avec les contrôles Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)** (anionique mais non polymérisable), Lip-PEG_{5K}-OMe **4a** (neutre et polymérisable) et Oct-PEG_{5K}-OMe **4b** (neutre et non polymérisable), pour évaluer l'impact du motif 1,2-dithiolane et des charges anioniques sur le processus de fonctionnalisation. Les résultats sont résumés ci-dessous (**Figure 21**).

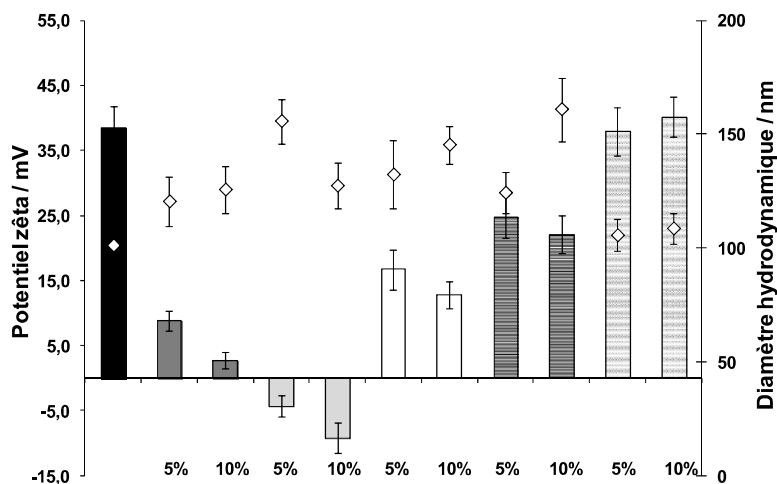


Figure 21 : Potentiel zêta (barres) et diamètre hydrodynamique (losanges) des complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ à N/P 10 nus (■) ou fonctionnalisés avec 5 ou 10 mol% de Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe (■), Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe (□), Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe (□), Lip-PEG_{5K}-OMe (▨) ou Oct-PEG_{5K}-OMe (▩) (vs détergent)

Les résultats obtenus confirment nos hypothèses, et montrent que l'utilisation conjointe d'un motif polyanionique et d'un motif polymérisable permet d'optimiser l'étape de fonctionnalisation. En effet, la fonctionnalisation de surface sera d'autant plus efficace que le potentiel zêta des NPs décorées sera abaissé par rapport aux NPs cationiques ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ nues (+38 mV). Les potentiels zêta des NPs décorées avec Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** (-4,3 et -9,2 mV pour 5 et 10 mol%, resp.) sont plus bas que ceux obtenus avec Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** (+8,8 et +2,7 mV pour 5 et 10 mol%, resp.), et les contrôles Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)** (+16,7 et +12,8 mV pour 5 et 10 mol%, resp.) ou Lip-PEG_{5K}-OMe **4a** (+24,9 et +22,1 mV pour 5 et 10 mol%, resp.). Les conjugués alliant interactions électrostatiques et polymérisation, **9a(p₃)** et **9a(p₅)**, permettent une fonctionnalisation plus efficace du système. De façon très intéressante, les deux propriétés semblent contribuer séparément au processus de fonctionnalisation. En effet, les conjugués **9b(p₃)** (chargé non polymérisable) et **4a** (polymérisable non chargé), même si moins performants que **9a(p₃)** et **9a(p₅)**, sont capables de diminuer la charge de surface des NPs cationiques de façon significative. Aussi, et de façon non surprenante, la fonctionnalisation électrostatique est légèrement plus efficace que la polymérisation (Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)** meilleur que Lip-PEG_{5K}-OMe **4a**). Pour ce qui est de l'ancre hydrophobe Oct-PEG_{5K}-OMe **4b**, qui ne présente aucune des deux propriétés, il est évident que l'effet hydrophobe seul n'est pas suffisant pour fonctionnaliser efficacement la surface. Dans ce cas, les NPs restent très cationiques, avec des potentiels zêta équivalents à ceux des NPs nues (+38 et +40,2 mV pour 5 et 10 mol%, resp.).

Cette étude a également révélée que la fonctionnalisation était plus efficace avec un penta-anion plutôt qu'un tri-anion. En effet, les potentiels zêta obtenus en utilisant les dérivés Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** et Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** passent de légèrement cationiques (dérivé tri-aspartate) à légèrement anioniques (dérivé penta-aspartate). De plus, notons que quelle que soit la formulation (exceptée Oct-PEG_{5K}-OMe **4b**), la quantité de conjugué pegylé n'a qu'un faible effet sur les résultats (10 mol% légèrement meilleur que 5 mol%). Finalement, les mesures de taille par DLS ont confirmé

l'efficacité du processus de fonctionnalisation. En effet, mis à part pour le composé **4b** inefficace, l'ajout du conjugué pegylé conduit systématiquement à une augmentation du diamètre hydrodynamique des NPs (de 20 à 50 nm suivant les conditions).

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi de conserver le conjugué Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** pour la suite du projet, meilleur candidat *a priori* pour la fonctionnalisation de surface des complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺.

III.5.3 MORPHOLOGIE DES COMPLEXES

Afin d'analyser la morphologie des complexes et de mesurer leur taille par MET, nous avons formulé des NPs à base de Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** nues, ou fonctionnalisées avec 5 mol% du conjugué polyanionique et polymérisable Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**. Les photos obtenues sont données dans la **Figure 22** ci-dessous.

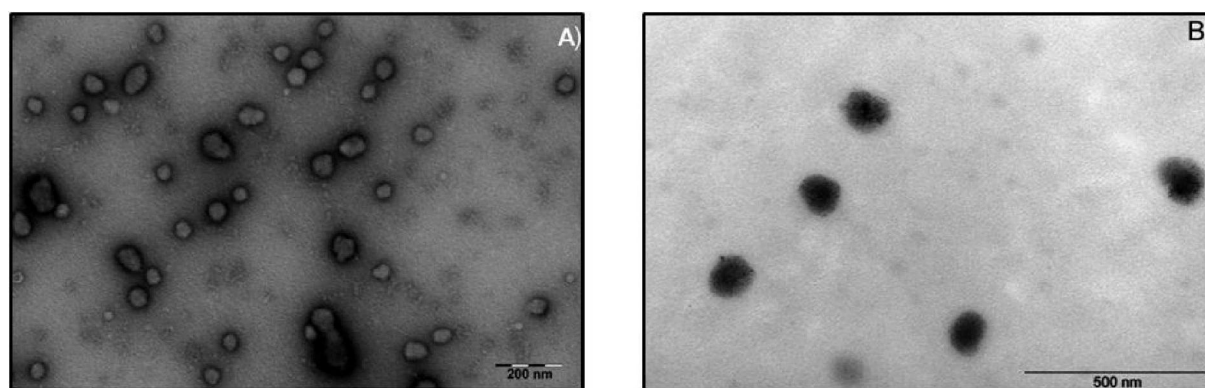


Figure 22 : Microscopie Electronique en Transmission des NPs ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ à N/P 10 **A)** nues, et **B)** avec 5 mol% de Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe

Ainsi, nous avons mesuré un diamètre de 60 ± 14 nm pour les NPs nues, et un diamètre de 128 ± 4 nm pour les NPs fonctionnalisées avec les conjugués pegylés. La fonctionnalisation entraîne une augmentation de la taille des particules, ce qui est en accord avec les résultats prédits par les expériences de DLS. Cette différence de taille provient de l'enveloppe de polyéthylène glycol, mais aussi de l'excès d'eau contenue dans les chaînes de PEG 5 kDa, qui n'est pas totalement éliminé par séchage lors de la préparation des échantillons. Les photos illustrent aussi la grande monodispersité qui peut être obtenue suivant cette stratégie.

III.5.4 EFFET DE SEL

La concentration du sodium dans les fluides biologiques est comprise entre 136 et 144 mM. Nous avons ensuite étudié la stabilité de nos formulations par un test de compétition en milieu salin par ajout de concentrations croissantes en NaCl (0-250 mM). Les complexes ont alors été formulés avec l'amphiphile Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** à N/P 10, puis décorés ou non par le conjugué Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** (10 mol%), avec ou sans DTT (10 mM). La dissociation des complexes a été appréciée par spectrofluorimétrie en mesurant l'intercalation du BET (**Figure 23**), avec des polyplexes de PEI

comme contrôles. Les intensités relatives de fluorescence, ou indices de dissociation (IDs) des complexes, ont été calculés à partir de l'**Equation (1)** (cf. **paragraphe III.4.2.1**).

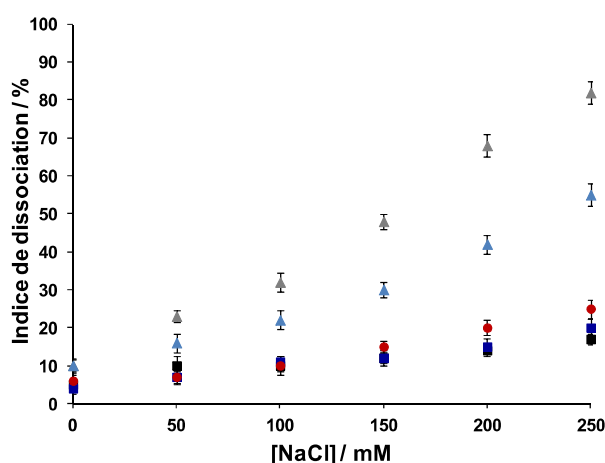


Figure 23 : Dissociation en solution saline à 25°C des complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ fraîchement préparés avec (▲) ou sans (■) 10 mM de DTT, décorés avec 10 mol% de Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe avec (▲) ou sans (■) 10 mM de DTT ; **contrôle** : complexes ADN/PEI (●)

Les résultats montrent que les complexes ADN/**3a** sont aussi stables que les polyplexes de PEI, les indices de dissociation étant respectivement de 18 et 25%, à 250 mM en NaCl. Par ailleurs, la fonctionnalisation par les conjugués pegylés n'a pas d'impact important sur la stabilité des formulations. En effet, nous avons des IDs du même ordre de grandeur pour les NPs ADN/**3a** nues, et fonctionnalisées avec Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**. Les résultats montrent également, comme dans le cas des expériences d'exclusion du bromure d'éthidium (cf. **paragraphe III.4.2.1**), que l'addition de DTT déstabilise les formulations à base du Lip-C₆-NH₃⁺ **3a**. En effet, la réduction du motif 1,2-dithiolane augmente l'accessibilité de l'ADN et conduit à des IDs plus hauts. Finalement, même si les NPs fonctionnalisées sont sensibles à l'ajout de DTT, l'effet est moins prononcé par rapport aux NPs nues (IDs inférieurs dans les mêmes conditions). Les NPs décorées sont ainsi moins sujettes à la dissociation que les NPs nues, ce qui rend compte de l'effet bouclier de l'enveloppe PEG.

Pour conclure, les complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ décorés ou non semblent stables en conditions salines physiologiques, puisque les IDs ne dépassent pas 15% à 150 mM en NaCl, tout en montrant une capacité à se dissocier sous conditions réductrices. Cela constitue des propriétés essentielles quant à la capacité de transfection des formulations.

III.6 CONCLUSION SUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES D'ADN ISSUS DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des complexes d'ADN basés sur des dérivés du 1,2-dithiolane nous a permis d'appréhender leur potentiel en tant qu'agents de transfert de gènes. Le système conduit à la formation de nanoparticules d'ADN cationiques stables et quasi-monomoléculaires (monodisperses et de petites tailles). Bien que n'ayant aucune preuve de la polymérisation du motif 1,2-dithiolane, celui-ci semble jouer un rôle essentiel dans la formulation

des NPs d'ADN. Par ailleurs, ce même motif agit en synergie avec la neutralisation des charges de surface produite par des conjugués anioniques pour conduire à une fonctionnalisation efficace des nanoparticules cationiques. En effet, ce sont les conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables qui se sont montrés les plus efficaces dans ce processus de fonctionnalisation ; le meilleur candidat étant le composé penta-aspartate Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**. Ce dernier permet d'obtenir une charge de surface légèrement anionique, et semble donc particulièrement intéressant dans le cadre d'une stratégie de ciblage cellulaire (*via* endocytose spécifique) pour limiter les interactions non spécifiques liées à l'utilisation de NPs cationiques.

IV. ETUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES NANOPARTICULES D'ADN A BASE DE 1,2-DITHIOLANE

Les conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables utilisés ci-dessus ont été choisis pour une preuve de concept, afin de démontrer leur capacité de fonctionnalisation. Cependant, l'objectif final consiste à lier des ligands DLC8-AS ciblant les chaînes LC8 de la dynéine, à l'extrémité des PEG pour améliorer le trafic intracellulaire des complexes d'ADN. Il apparaît donc primordial de s'assurer que ces systèmes soient en mesure de transfecter les cellules.

IV.1 TRANSFECTION *IN VITRO* DES COMPLEXES

Nous avons évalué l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des NPs formulées avec l'amphiphile Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** à N/P 2, 5 et 10, nues ou fonctionnalisées par 5 mol% de Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**, sur les lignées cellulaires COS-7 (**Figure 24**). Des polyplexes de JetPEI à N/P 10 ainsi que l'ADN nu ont été pris comme contrôles positif et négatif, respectivement.

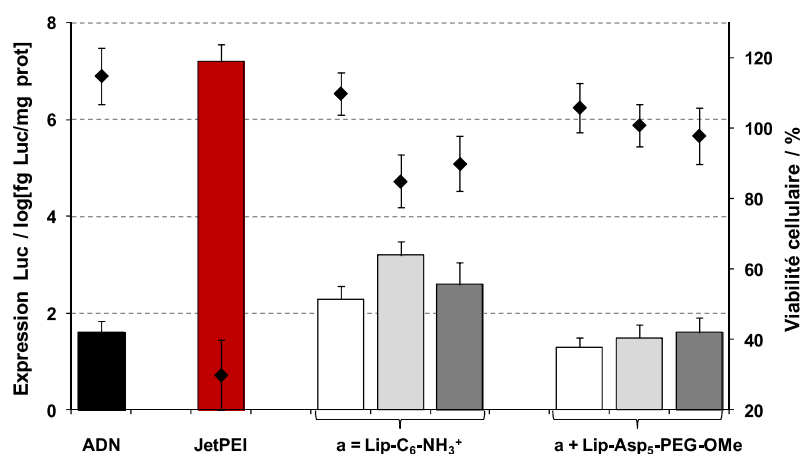


Figure 24 : Efficacité de transfection (barres) et viabilité cellulaire (losanges) sur cellules COS-7 de NPs d'ADN formulées avec JetPEI à N/P 10, Lip-C₆-NH₃⁺ à N/P 2 (□), 5 (◻) ou 10 (■), et Lip-C₆-NH₃⁺ avec 5 mol% de Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe ; **contrôle négatif** : ADN

A notre grande surprise, les niveaux de transfection des NPs formulées avec Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** ne sont que légèrement supérieurs par rapport à l'ADN nu (~40 fois pour N/P 5) et demeurent très en deçà de ceux des polyplexes de JetPEI (2 à 3 ordres de grandeur). En conséquence directe, nos NPs

cationiques sont mieux tolérées que les complexes de JetPEI (~90% et 30%, respectivement). Ce résultat très décevant est particulièrement surprenant puisque Balakirev et *al* ont montré que des complexes, formulés avec des lipides cationiques contenant le motif 1,2-dithiolane, donnaient des taux de transfection très intéressants *in vitro*.⁴⁹ Dans ce cas, la libération de l'ADN a été attribuée à la réduction des motifs 1,2-dithiolane dans la cellule, et plus particulièrement dans le noyau où le milieu est davantage réducteur. Bien évidemment, les NPs fonctionnalisées, conduisent quant à elles à un niveau d'expression de la luciférase très bas, du même ordre de grandeur que l'ADN nu. Ce résultat était attendu puisque ces complexes, « furtifs » de par la présence d'une enveloppe PEG, présentent un potentiel de surface légèrement négatif et n'ont aucun élément de ciblage.

IV.2 INTERNALISATION CELLULAIRE DES COMPLEXES

La faible efficacité de transfection des complexes en dépit de leur potentiel de surface cationique pourrait s'expliquer par une mauvaise capacité d'internalisation. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons évalué le profil de pénétration cellulaire des NPs cationiques nues par des expériences de cytométrie de flux (principe en **Annexe 3**) sur cellules COS-7. Nous avons également testé les NPs fonctionnalisées. Ainsi l'ADN plasmidique a tout d'abord été marqué avec du BET. Les complexes ont ensuite été formulés avec Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** à N/P 10 (avec ou sans 5 mol% de Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**). Le JetPEI à N/P 10 a été utilisé comme contrôle (**Figure 25**).

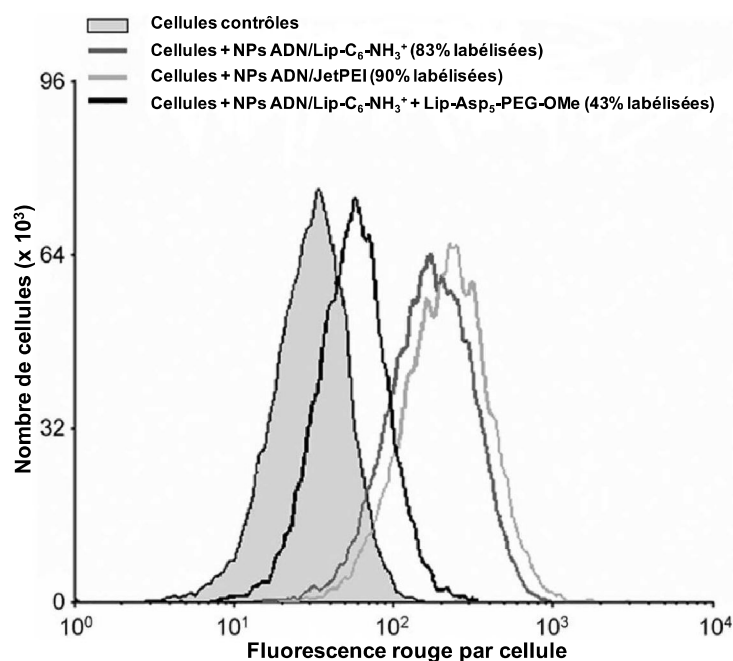


Figure 25 : Internalisation des NPs BET-ADN formulées à partir de Lip-C₆-NH₃⁺ à N/P 10 (■), Lip-C₆-NH₃⁺ à N/P 10 avec 5 mol% de Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe (■), et JetPEI à N/P 10 (■) vs cellules contrôles (■)

Les résultats montrent de grandes efficacités d'internalisation pour les NPs cationiques nues (non pegylées). En effet, 83% des cellules traitées avec les NPs BET-ADN/**3a** montrent une augmentation de la fluorescence dans le rouge (marquage au BET) par rapport aux cellules contrôles (non traitées), contre 90% dans le cas des NPs BET-ADN/JetPEI. Comme attendu, les NPs décorées avec le conjugué

Lip-Asp₅-PEG_{5k}-OMe **9a(p₅)** sont moins bien internalisées que les NPs cationiques (48% vs 83%, resp.), ce qui confirme la fonctionnalisation. Ainsi, ces résultats excluent un éventuel problème d'endocytose, mais ne permettent pas d'expliquer les faibles efficacités de transfection observées avec notre système.

IV.3 CONCLUSION SUR L'ÉTUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES NANOPARTICULES D'ADN A BASE DE 1,2-DITHIOLANE

Pour tenter de comprendre ces résultats plutôt décevants, nous avons réalisé une expérience de transfection avec les NPs ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ en présence d'un agent endosomolytique, la chloroquine (résultats non présentés ici). Toutefois, ce traitement n'a pas permis une amélioration de l'efficacité de transfection. Ainsi, l'échappement endosomal ne semble pas être une étape limitante dans le cas de ces formulations. Comme décrit dans la partie bibliographique (**partie I, paragraphe IV.3.2**), le trafic intracellulaire des complexes jusqu'au noyau cellulaire représente bien souvent une étape limitante au transfert de gènes par les vecteurs non viraux. Nous pouvons ainsi imaginer que les NPs à base de lipoyl, en sortie des endosomes, rencontrent des difficultés à atteindre le noyau de la cellule, où le milieu est davantage réducteur que dans le cytosol. Une autre possibilité serait la trop grande stabilité des NPs après polymérisation du 1,2-dithiolane, qui limiterait la décomplexation totale ADN/vecteur et la libération de l'ADN. En effet, les expériences de dissociation en solution saline (cf. **paragraphe III.5.4**) n'ont permis d'obtenir des indices de dissociation significatifs qu'à de hautes concentrations en sel (250 mM) et DTT (10 mM). Si l'on s'intéresse de plus près aux systèmes rédox intracellulaires, le glutathion réduit (GSH) ne semble pas pouvoir réduire les résidus lipoyl, dans le sens où il n'est pas aussi réducteur que la DTT à pH 7. En effet, les potentiels de réduction standard des couples considérés sont les suivants : E_0' (GSSH/GSH) = -263 mV,⁶⁸ E_0' (DTT_{ox}/DTT_{red}) = -330 mV⁶⁹ et E_0' (LA/DHLA) = -320 mV.⁷⁰ Cependant, comme évoqué précédemment, les lipoamides sont efficacement réduits dans les cellules de mammifères par les enzymes NADPH-dépendantes lipoamide déshydrogénase et thiorédoxine réductase.⁶³ Par ailleurs, Balakirev et al ont montré que la réduction de leurs complexes à base de lipoyl était essentiellement due à la thiorédoxine réductase, et que la lipoamide déshydrogénase était inefficace.⁴⁹ Il est donc étonnant que notre système, de structure similaire, ne soit pas réduit efficacement par cette enzyme. La grande affinité du Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** pour l'ADN, combinée au haut degré de polymérisation obtenu empêche probablement la réduction de tous les résidus, et la libération effective de l'ADN. Finalement, une dernière hypothèse serait liée à l'oxydation *in situ* des ponts disulfures en S-oxydes ou thiosulfates, qui pourraient être plus difficiles à réduire.⁷¹

V. CONCLUSION SUR LE SYSTEME BASE SUR DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE

Dans le cadre de ce projet, nous avons synthétisé un amphiphile cationique et polymérisable dérivé de l'acide lipoïque, contenant le motif 1,2-dithiolane. Utilisé en tant qu'agent de compaction de l'ADN, celui-ci s'est montré très efficace et a permis d'obtenir une population monodisperse de

NPs cationiques stables et de petites tailles (~100 nm). La matrice ADN, en augmentant localement la concentration du détergent cationique, permettrait d'amorcer la polymérisation en conditions douces. Nous avons également préparé des conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables pour fonctionnaliser efficacement la surface des NPs d'ADN obtenues et former des objets plus complexes. D'après les résultats, le processus combinerait interactions ioniques et polymérisation du motif 1,2-dithiolane. En effet, la neutralisation de la charge de surface cationique des NPs corrèle avec le nombre de charges anioniques portées par le conjugué pegylé, ainsi qu'avec la présence ou non du motif lipoyl. La possibilité d'avoir des NPs légèrement anioniques permet d'envisager une réduction significative des interactions non spécifiques avec les constituants biologiques. Toutefois, ce système montre d'importantes limitations, puisque les NPs cationiques semblent trop stables pour qu'une transfection efficace puisse avoir lieu. Cela pourrait résulter d'un transport cytosolique non favorable jusqu'au noyau cellulaire et/ou d'un effet d'encapsulation trop fort de l'ADN par la polymérisation intermoléculaire des résidus 1,2-dithiolane, et/ou d'une oxydation des thiols en S-oxyde. Tous ces phénomènes, en empêchant une réduction efficace des ponts disulfures par les systèmes rédox intracellulaires, altéreraient la libération et *in fine* l'expression de l'ADN.

L'objectif général du projet est de formuler des NPs portant des séquences DLC8-AS (BS69) dimériques pour se lier à LC8 et améliorer le transport cytosolique des complexes jusqu'au noyau cellulaire. D'après l'étude réalisée ci-dessus, le système basé sur des dérivés du motif 1,2-dithiolane, tel qu'il est présenté ici, ne semble pas viable dans un contexte de transfert de gènes. Même si l'utilisation de motifs NLS pourrait favoriser l'entrée des complexes dans le noyau, où les conditions rédox sont bien plus favorables à une libération de l'ADN, nous avons choisi de ne pas continuer dans cette voie, et de s'orienter vers d'autres systèmes non viraux pour atteindre les objectifs fixés.

CHAPITRE III : FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES PAR DES DERIVES CYSTEINE

L'équipe de J. P. Behr puis notre équipe avons montré que l'utilisation d'amphiphiles cationiques dimérisables à base de résidus cystéine permettait de formuler des NPs d'ADN de petites tailles (~ un plasmide par particule) avec des taux de transfection satisfaisants.^{32, 72} Par ailleurs, notre équipe a aussi mis en avant l'intérêt des chaînes hautement fluorées, de par leur caractère hydrophobe et lipophile singulier, dans les formulations vectorisantes (plus résistantes en milieu agressif, diminution des interactions non spécifiques).^{32, 33, 73}

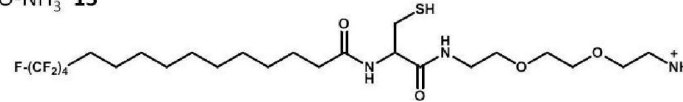
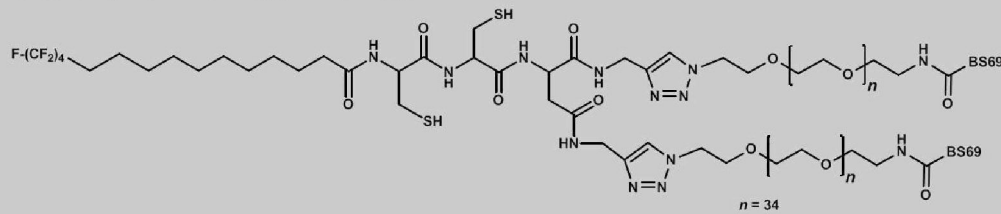
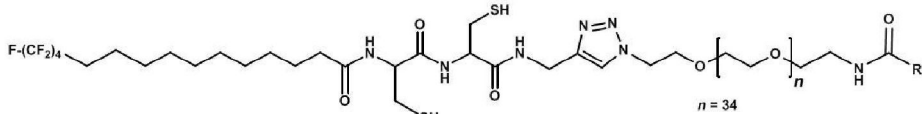
Comme déjà discuté brièvement (cf. **chapitre I, paragraphe III.2**), l'injection intracytoplasmique de NPs d'ADN formées grâce à un amphiphile perfluoroalkylé monocationique basé sur un résidu cystéine, puis fonctionnalisées par une ancre hydrophobe perfluoroalkylée et pegylée (5 kDa) contenant une seule DLC8-AS, n'a pas permis de montrer l'effet escompté. Ceci a été attribué aux faibles taux de fonctionnalisation obtenus. En effet, la décoration des NPs d'ADN n'a engendré qu'une faible diminution des potentiels zêta en valeur absolue, malgré l'utilisation de taux de conjugués pegylés de l'ordre de 10 mol% (par rapport aux agents cationiques) qui limitent fortement l'homogénéité des formulations.

Dans ce contexte, la stratégie envisagée ici (cf. **chapitre I, paragraphe VI.2**) consiste à coupler sur des complexes d'ADN non plus des monomères mais des dimères de séquences DLC8-AS (BS69, cf. séquence **Tableau 4**), portés non plus par une ancre hydrophobe mais par un amphiphile perfluoroalkylé polymérisable et pegylé. L'effet chélate découlant du remplacement de la séquence DLC8-AS monomérique par un dimère pourrait compenser les faibles taux de fonctionnalisation en améliorant l'affinité vis-à-vis de la cible d'une part. D'autre part, la fonctionnalisation devrait s'en trouver améliorée grâce à l'addition d'une force motrice supplémentaire provenant de l'oligomérisation possible du conjugué pegylé avec le système. Le processus de formulation est schématisé dans la **Figure 12 (chapitre I, paragraphe VI.2)**. Il consiste à co-formuler l'ADN en présence de l'agent compactant dimérisable, auquel est ajouté un conjugué polymérisable portant le dimère bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS).

I. DESIGN DES MOLECULES A BASE DE CYSTEINE ET DES CONTROLES

La structure des composés utilisés pour la formulation des NPs d'ADN fonctionnalisées par les dimères de séquence BS69 est donnée dans le **Tableau 6** ci-dessous.

Tableau 6 : Amphiphile, conjugué pegylé polymérisable bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) et contrôles

Amphiphile monocationique dimérisable	F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH ₃ ⁺ 13 
Conjugués PEG polymérisables	F_4C_{10} -Cyst ₂ -Asp-bis-(PEG _{1,6K} -BS69) 21(c₂) 
	(R = BS69) F_4C_{10} -Cyst ₂ -mono-(PEG _{1,6K} -BS69) 24a(c₂) (R = CH ₃) F_4C_{10} -Cyst ₂ -mono-(PEG _{1,6K} -Ac) 24b(c₂) 

L'amphiphile cationique et perfluoroalkylé F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** comporte un motif cystéine, qui joue le rôle d'agent de liaison entre une partie polaire monocationique (triéthylène oxy terminé par un groupement ammonium) et une partie apolaire perfluoroalkylée. Pour fonctionnaliser les complexes d'ADN avec des dimères de séquences DLC8-AS, nous avons développé un conjugué perfluoroalkylé polymérisable et pegylé F_4C_{10} -Cyst₂-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₂)**. Ce dernier est doté d'un motif bis-cystéine connecté à (i) un résidu apolaire perfluoroalkylé à son extrémité N-terminale et (ii) deux conjugués PEG_{1,6K}-DLC8-AS à son extrémité C-terminale. Les conjugués PEG_{1,6K}-DLC8-AS sont introduits au moyen d'une stratégie de chimie Click *via* un lien dérivé de l'acide aspartique. Ainsi, la fonction thiol des cystéines permet la co-oligomérisation du conjugué pégylé avec l'agent cationique. La chaîne perfluoroalkylée, quant à elle, joue le rôle d'ancre hydrophobe pour renforcer et favoriser l'auto-association. Nous avons choisi, pour des raisons de commodité, un espaceur PEG 1,6 kDa, suffisant dans le cas d'études préliminaires *in vitro*. Pour aider à l'interprétation des résultats, nous avons également synthétisé les contrôles F_4C_{10} -Cyst₂-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₂)** dont le PEG est terminé par un groupement acétyle, et F_4C_{10} -Cyst₂-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₂)** fonctionnalisé par un monomère de PEG_{1,6K}-DLC8-AS. Ce dernier ayant pour but de mettre en avant l'intérêt de ligands dimériques pour l'interaction avec les chaînes légères LC8 de la dynéine.

La cycloaddition 1,3-dipolaire azoture/alcyne de Huisgen catalysée par le cuivre(I) (CuAAC), relevant de la chimie Click,⁷⁴ est bien souvent choisie dans la synthèse de macromolécules complexes telles que les cyclodextrines⁷⁵ ou encore les dendrimères.⁷⁶ Notons que le choix d'une procédure CuAAC en transfert de gènes peut potentiellement avoir des conséquences sur l'efficacité des complexes

formulés. En effet, l'unité triazole générée, de façon similaire à d'autres hétérocycles, peut agir comme accepteur de liaisons hydrogène, intercalant de l'ADN, ou peut avoir des propriétés tampon ($pK_a = 6$). Ces propriétés peuvent avoir un impact sur la stabilité, la sortie endosomale et la transfection des complexes.⁷⁷ Dans notre cas, les unités triazoles ne devraient pas interférer puisqu'elles se retrouvent dans la structure des agents de fonctionnalisation, qui sont présents en faible quantité dans les formulations (i.e. à raison de quelques mol% vs l'agent compactant).

II. SYNTHÈSE DE L'AMPHIPHILE CATIONIQUE ET DES CONJUGUES PEGYLES

II.1 SYNTHÈSE DE L'AMPHIPHILE MONOCATIONIQUE ET PERFLUOROALKYLE DIMÉRISABLE

Le composé F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** a été obtenu suivant un schéma de synthèse modifié par rapport à celui déjà rapporté par l'équipe,³³ en quatre étapes suivant une stratégie Fmoc classique sur support solide (**Schéma 3**).

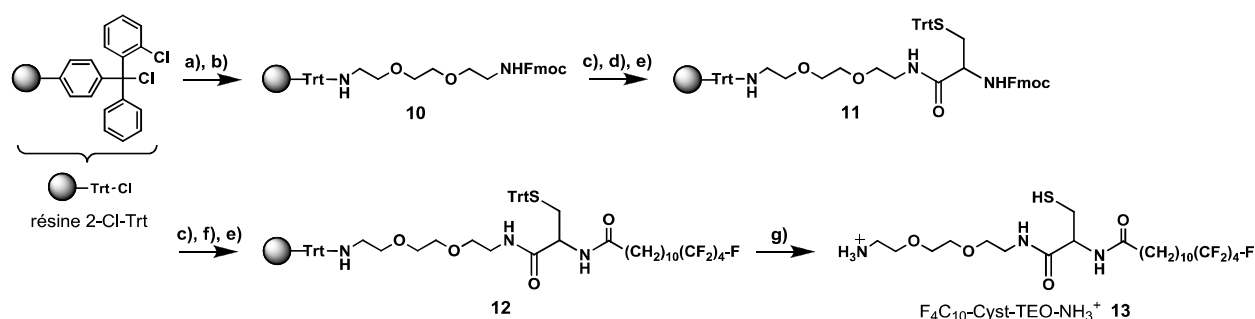


Schéma 3 : Synthèse de l'amphiphile monocationique et perfluoroalkyle dimérisable

a) **couplage** : $FmocHN-TEO-NH_3^+Cl^-$ (1,5 eq vs. résine), DIPEA (4 eq), DMF (2 cycles); b) **capping** : DMF/MeOH 65:10; c) **déprotection** : DMF/pipéridine 4:1 (4 cycles); d) **couplage** : $Fmoc-Cyst(Trt)-OH$ (2 eq), HOBt (3 eq), DIC (2,4 eq), DMF (2 cycles); e) **capping** : Ac_2O (0,5 M), DIPEA (20 eq), DMF; f) **couplage** : $F-(CF_2)_4(CH_2)_{10}-COOH$ (2 eq), HOBt (3 eq), DIC (2,4 eq), DMF (2 cycles); g) TFA/ CH_2Cl_2 1:1, 5% TIS

La diamine homobifonctionnelle $FmocHN-TEO-NH_2$ (sous forme de chlorure), dont l'une des amines est protégée par un groupement Fmoc, est greffée au niveau de sa fonction libre sur la résine 2-Cl-Trt en présence de DIPEA pour donner l'intermédiaire **10** (amine immobilisée). Après neutralisation des fonctions réactives résiduelles de la résine, le groupement *N*-Fmoc est déprotégé pour permettre l'élongation de la molécule. Un résidu cystéine $Fmoc-Cyst(Trt)-OH$, protégé sur la chaîne latérale par un groupement trityle pour des raisons d'orthogonalité, est alors introduit après activation de sa fonction acide carboxylique en présence de DIC/HOBt. Cette étape de couplage est ainsi réalisée deux fois successivement, puis suivie d'une étape de *capping* pour conduire à l'acide aminé **11**. La dernière étape consiste à condenser l'acide perfluoroalkyle $F-(CF_2)_4(CH_2)_{10}-COOH$,⁷⁸ préalablement activé par le couple DIC/HOBt, sur l'extrémité *N*-terminale libre de l'intermédiaire **11**, pour donner l'amphiphile amide **12** immobilisé. Le clivage de la résine ainsi que la déprotection des chaînes latérales des résidus cystéine est finalement réalisé par une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 50% dans le dichlorométhane, en présence de triisopropylsilane (TIS) utilisé comme agent piègeur de radicaux. Ce schéma de synthèse permet de conduire au composé attendu F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** avec un rendement global de 72%.

II.2 SYNTHÈSE DES CONJUGUÉS PEGYLES PERFLUOROALKYLES OLIGOMÉRISABLES

II.2.1 PREMIÈRE APPROCHE

La stratégie envisagée pour la synthèse des conjugués perfluoroalkylés mono- et bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) est également une procédure alliant phase solide et phase liquide, illustrée dans le **Schéma 4** ci-dessous.

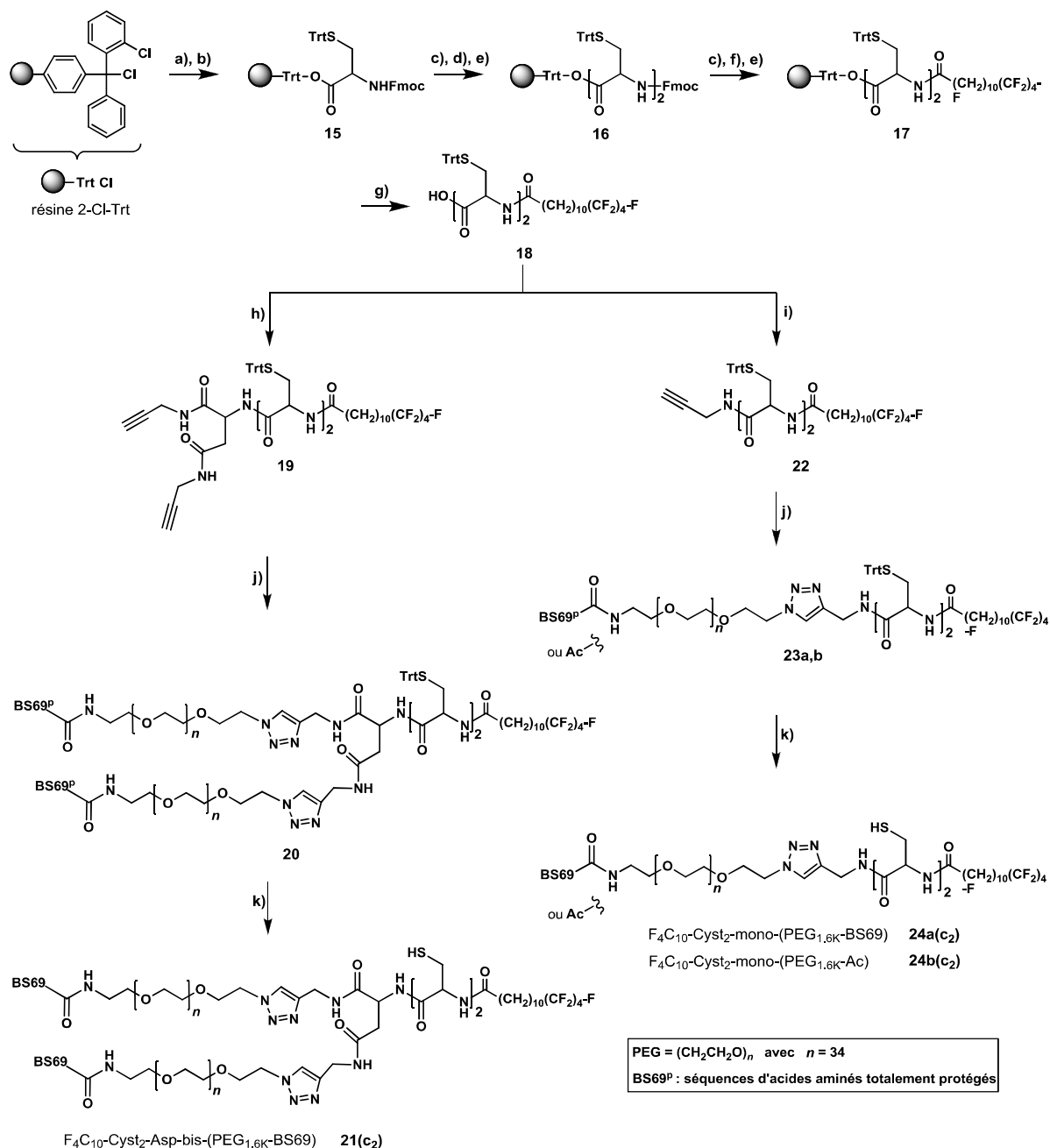


Schéma 4 : Synthèse du conjugué pegylé polymérisable bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) et des contrôles

a) **couplage** : Fmoc-Cyst(Trt)-OH (2 eq vs. résine), DIPEA (3 eq), DMF (2 cycles); b) **capping** : DMF/MeOH 65:10; c) **déprotection** : DMF/pipéridine 4 : 1 (4 cycles); d) **couplage** : Fmoc-Cyst(Trt)-OH (2 eq), HOBT (3 eq), DIC (2,4 eq), DMF (2 cycles); e) **capping** : Ac₂O (0,5 M), DIPEA (20 eq), DMF; f) **couplage** : F-(CF₂)₄(CH₂)₁₀-COOH (2 eq), HOBT (3 eq), DIC (2,4 eq), DMF (2 cycles); g) CH₂Cl₂/TFE/CH₃CO₂H 4:1:1; h) H₂N-Asp(CH₂CCH)₂ (2 eq), HOBT (1,5 eq), DIC (1,2 eq), DIPEA (2 eq), DMF; i) propargylamine (2 eq), HOBT (1,5 eq), DIC (1,2 eq), DIPEA (2 eq), DMF; j) **14a,b** (2,2 eq pour **20** et 1,2 eq pour **23a,b**), CuI (2 eq pour **20** et **23a**, 1 eq pour **23b**), DIPEA (15 eq), CH₃CO₂H (1 eq), THF; k) TFA/TIS 95:5

II.2.1.1 SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS DE CLICK

D'une façon générale, l'approche est basée sur l'obtention d'une part des azotures protégés au niveau des chaînes latérales du peptide N₃-PEG_{1,6K}-BS69^p **14a** (et *a fortiori* du contrôle N₃-PEG_{1,6K}-Ac **14b**), et d'autre part des alcynes perfluoroalkylés. Les précurseurs sont ensuite engagés dans une étape clés de chimie Click, permettant de lier la partie polaire pegylée à la partie apolaire perfluoroalkylée.

- Le peptide BS69^p (AcétylNH-PRMLHRST**Q**TT-CONH(CH₂)₅COOH) totalement protégé au niveau de ses chaînes latérales, portant un lien aminocaproïque à l'extrémité C-terminale, a été synthétisé suivant une procédure Fmoc classique sur support solide déjà décrite.²⁵ Un couplage peptidique a ensuite été réalisé avec le PEG commercial hétérobifonctionnel et monodisperse N₃-PEG_{1,6K}-NH₂ pour conduire au composé de type azoture N₃-PEG_{1,6K}-BS69^p **14a** (~70%) (**Schéma 5**). Parallèlement, la fonction amine du PEG commercial N₃-PEG_{1,6K}-NH₂ a été acétylée dans des conditions standard pour l'obtention du précurseur N₃-PEG_{1,6K}-Ac **14b**.

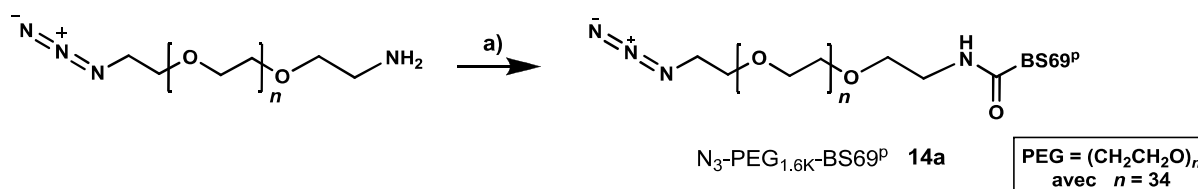


Schéma 5 : Synthèse de l'azoture PEG_{1,6K}-BS69^p
 a) BS69^p (0,7 eq), HBTU (0,8 eq), DIPEA (2 eq), DMF

- A ce stade, il s'agit d'introduire une ou deux fonctions alcyne vrai sur l'amphiphile polymérisable, pour les réactions mono- ou double-Click, respectivement prévues. La propargylamine est ainsi couplée sur la fonction acide carboxylique de l'amphiphile perfluoroalkylé polymérisable **18**, soit directement pour conduire au mono-alcyne **22** (71%), soit par l'intermédiaire d'un dérivé aspartique bis-alcyne préalablement fonctionnalisé (H₂N-Asp(CH₂CCH)₂) pour synthétiser le bis-alcyne **19** (61%).

II.2.1.2 MONO- ET DOUBLE-CLICK

Après l'obtention des précurseurs de type azoture **14a,b** et alcynes **19** et **22**, la réaction CuAAC a pu être envisagée pour la synthèse des conjugués bis-fonctionnalisés F₄C₁₀-[Cyst(Trt)]₂-bis-(PEG_{1,6K}-BS69^p) **20** et mono-fonctionnalisés F₄C₁₀-[Cyst(Trt)]₂-mono-(PEG_{1,6K}-BS69^p) **23a** et F₄C₁₀-[Cyst(Trt)]₂-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **23b** désirés. Le facteur crucial pour ce type de procédure est le maintien du cuivre sous sa forme active (I) en concentration suffisante. Les méthodes les plus couramment rencontrées dans la littérature consistent à utiliser une source catalytique de cuivre(II) en présence d'un excès d'agent réducteur, et notamment CuSO₄/ascorbate de sodium.⁷⁴ Plusieurs essais ont été effectués dans ces conditions, mais dans tous les cas le taux de conversion du précurseur alcyne est resté faible. Une autre méthode consiste à utiliser directement des sels de cuivre(I). Nous avons alors tenté de catalyser la réaction avec le complexe de coordination CuI.(EtO)₃P relativement stable à l'air,⁷⁹ mais les mêmes constatations ont été faites dans ces conditions. Finalement, la réaction mono-Click

entre N_3 -PEG_{1,6K}-Ac **14b** et l'alcyne vrai perfluoroalkylé et polymérisable **22** a pu être menée en présence d'un équivalent d'iodure de cuivre(I) (CuI), de quinze équivalents de DIPEA et d'un équivalent d'acide acétique au reflux du THF. La conversion de l'alcyne **22** est alors totale après une nuit et conduit au composé désiré F₄C₁₀-[Cyst(Trt)]₂-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **23b** avec un rendement de 72%. Notons que la présence d'acide acétique est cruciale pour améliorer la réaction de cycloaddition.⁸⁰ La dernière étape de clivage des groupements protecteurs des cystéines en milieu TFA/TIS permet d'obtenir le contrôle F₄C₁₀-Cyst₂-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₂)** (75%). La synthèse du second contrôle, F₄C₁₀-Cyst₂-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₂)**, a été interrompue à cause de la déprotection des groupements trityles pendant la réaction de chimie Click, malgré la présence d'un large excès de DIPEA.

La réaction de double-Click faisant intervenir le précurseur azoture protégé N_3 -PEG_{1,6K}-BS69^p **14a** et le bis-alcyne perfluoroalkylé et polymérisable **19** a confirmé les problèmes majeurs liés à cette stratégie. En effet, même si deux équivalents de CuI ont permis d'observer un taux de conversion total du bis-alcyne **19** après une nuit au reflux du THF, le suivi CCM a indiqué la présence de plusieurs produits et de trityle libre au front. Dans ce cas, les sous-produits observés pourraient provenir d'une réaction CuAAC incomplète, c'est-à-dire de la présence d'un mélange de composés mono- et bis-(PEG_{1,6K}-BS69^p). En effet, nous pouvons imaginer un encombrement stérique trop grand limitant la double réaction. Par ailleurs, la déprotection même partielle des cystéines pourrait laisser place à une polymérisation intermoléculaire des thiols, favorisée en milieu basique. Une analyse par RMN du ¹H des composés majoritaires révélera effectivement la perte des groupements S-trityle des cystéines dans ces conditions. Toutefois, après déprotection en milieu TFA/TIS, une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution a permis de confirmer l'obtention du conjugué F₄C₁₀-Cyst₂-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₂)**, et donc la faisabilité d'une double réaction de chimie Click pour la formation de dérivés bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS). Le spectre de masse (HRMS) de ce composé est donné dans la **Figure 26** ci-dessous. Pour autant, nous avons décidé d'adopter une autre stratégie pour s'affranchir des résidus S-trityle trop labiles.

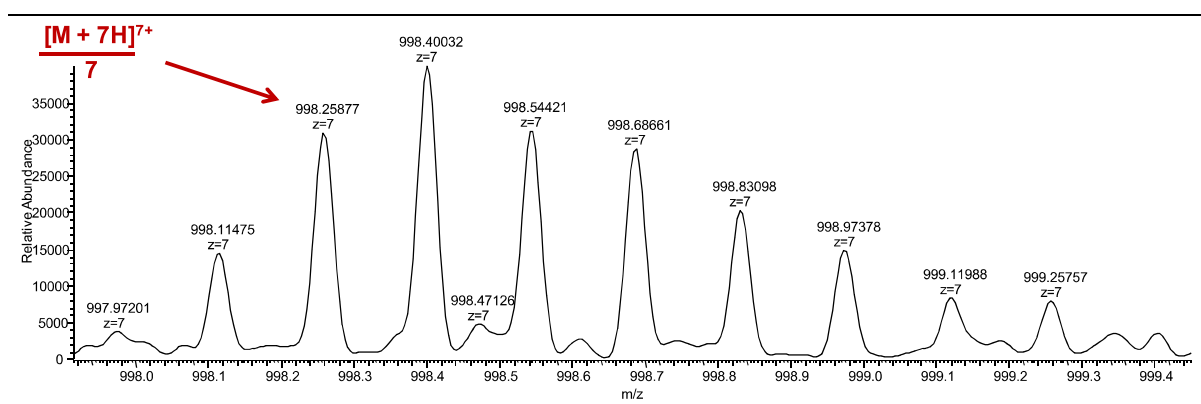


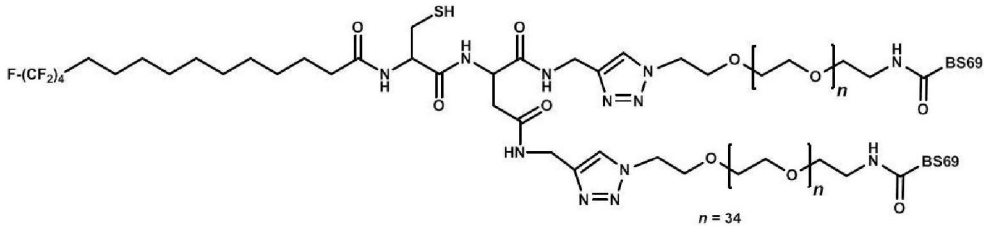
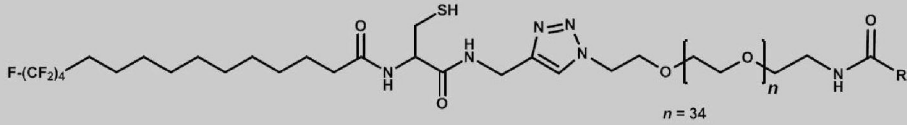
Figure 26 : Spectre HRMS en mode positif du conjugué F₄C₁₀-Cyst₂-Asp-bis-(PEG_{16K}-BS69)

M = 6980,74 (FTMS-ESI Orbitrap)

II.2.2 SECONDE APPROCHE

Pour s'affranchir des S-trityles, nous avons envisagé la synthèse des composés pegylés perfluoroalkylés d'après une stratégie précédemment développée au laboratoire pour l'obtention de l'amphiphile F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13**, c'est-à-dire au départ de la diméthylthiazolidine **25**. Pour des raisons de faisabilité, nous avons finalement choisi de remplacer le lien bis-cystéine des conjugués pegylés par un motif mono-cystéine. Ces nouveaux agents de fonctionnalisation conservent toutefois des capacités de co-oligomérisation avec l'agent cationique **13**. Ainsi, les composés utilisés pour la fonctionnalisation des complexes d'ADN sont représentés dans le **Tableau 7**, et le nouveau schéma réactionnel est illustré dans le **Schéma 5** ci-après.

Tableau 7 : Conjugué pegylé dimérisable bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) et contrôles

Conjugés PEG dimérisables	F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG _{1,6K} -BS69) 21(c₁) 
	(R = BS69) F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG _{1,6K} -BS69) 24a(c₁) (R = CH ₃) F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG _{1,6K} -Ac) 24b(c₁) 

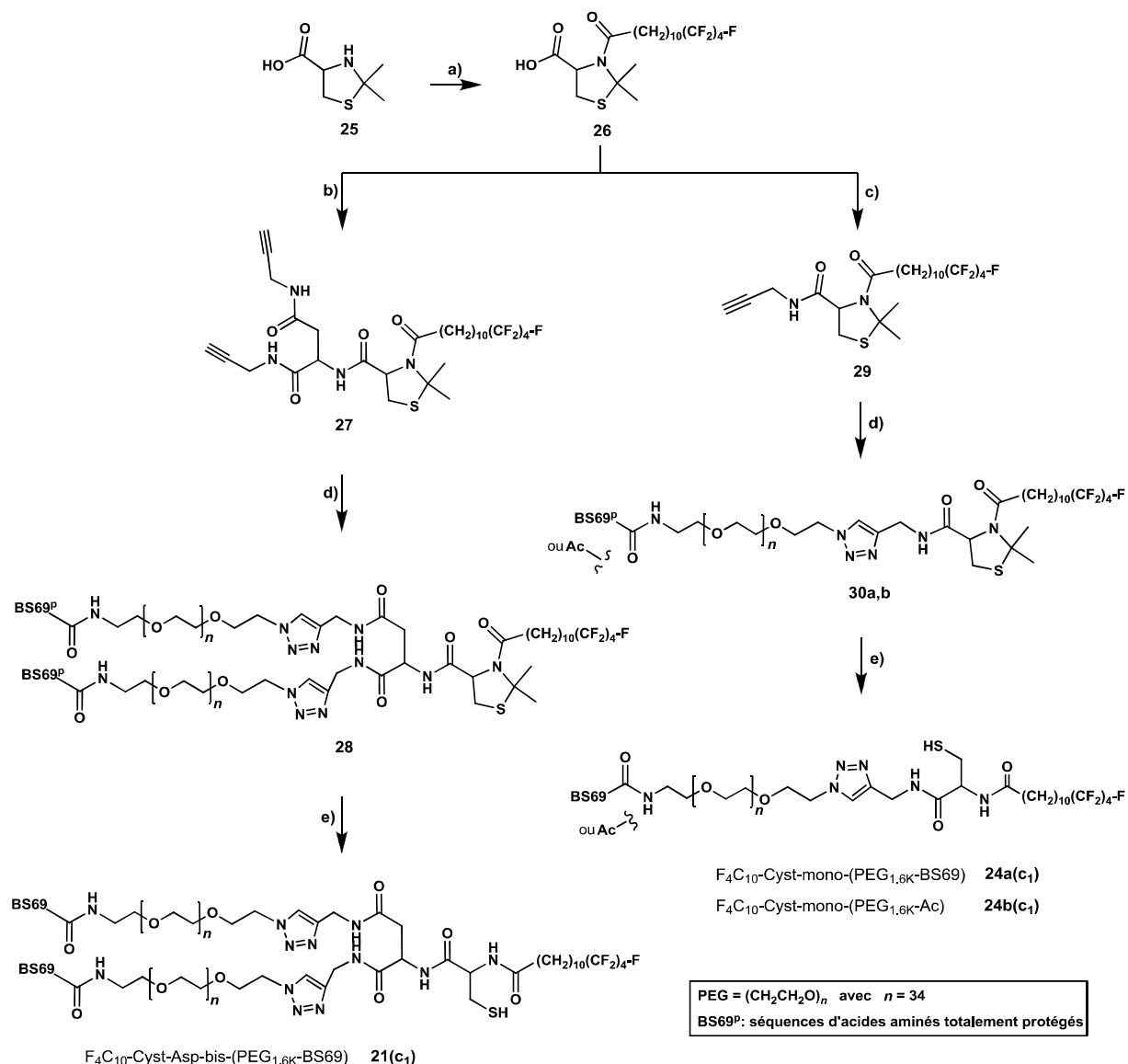


Schéma 5 : Synthèse du conjugué pegylé dimérisable bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) et des contrôles

a) F-(CF₂)₄(CH₂)₁₀-COCl (préparé *in situ* au départ de l'acide correspondant), DIPEA, CH₂Cl₂; b) H₂N-Asp(CH₂CCH)₂ (2 eq), HOBT (1,5 eq), DIC (1,2 eq), DIPEA (2 eq), DMF; c) propargylamine (2 eq), HOBT (1,5 eq), DIC (1,2 eq), DIPEA (2 eq), DMF; d) **14a,b** (2,2 eq pour **28** et 1,2 eq pour **30a,b**), CuI (2 eq pour **28** et **30a**, 1 eq pour **30b**), DIPEA (5 eq), CH₃CO₂H (1 eq), THF; e) TFA/TIS 95:5

Dans une première étape, la fonction amine secondaire de la diméthylthiazolidine **25** est couplée au chlorure de l'acide perfluoroalkylé F-(CF₂)₄(CH₂)₁₀-COOH, pour conduire à la thiazolidine fluorée **26** selon un protocole déjà décrit.³³ La fonction acide carboxylique du composé **26** est ensuite condensée sur la propargylamine pour conduire au mono-alcyne **29** (74%), ou sur le dérivé aspartique bis-alcyne H₂N-Asp(CH₂CCH)₂ pour donner le bis-alcyne **27** (82%).

Le composé **29** est ensuite engagé dans la réaction mono-Click avec N₃-PEG_{1,6K}-BS69^P **14a** ou N₃-PEG_{1,6K}-Ac **14b**, permettant d'obtenir F₄C₁₀-Cyst(Dmt)-mono-(PEG_{1,6K}-BS69^P) **30a** (74%) et F₄C₁₀-Cyst(Dmt)-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **30b** (65%), respectivement. La dernière étape est la régénération des chaînes latérales des acides aminés en milieu acide permettant d'accéder à F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₁)** (78%) et F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** (65%). Notons que le PEG acétylé **14b** a été introduit sur la partie apolaire perfluoroalkylé en présence d'un équivalent de CuI, alors que deux

équivalents ont été nécessaires dans le cas du conjugué PEG-BS69^p **14a**. Les nombreux sites de chélation potentiel du cuivre présents sur la séquence peptidique BS69 pourraient expliquer les quantités de CuI introduites.

Parallèlement, la réaction double-Click entre le composé **27** et N₃-PEG_{1,6K}-BS69^p **14a** conduit au conjugué F₄C₁₀-Cyst(Dmt)-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69^p) **28** (77%). Une dernière étape de déprotection des acides aminés en milieu acide permet d'obtenir le composé désiré F₄C₁₀-Cyst-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₁)** avec environ 85% de rendement.

II.2.3 CONCLUSION SUR LA SYNTHÈSE DES AMPHIPHILES CYSTEINE

Pour conclure, nous avons mis au point une méthode efficace, alliant phase solide et chimie Click, pour obtenir des macromolécules complexes portant un dimère de séquences de liaison à la chaîne légère LC8 de la dynéine. Malgré un schéma de synthèse plutôt simple, plusieurs difficultés rentrent en jeu :

- le suivi des synthèses par chromatographie sur couche mince qui nécessite l'utilisation de trois à quatre révélateurs différents,
- les nombreuses étapes de purification des intermédiaires et produits finaux,
- leur caractérisation,
- l'instabilité des thiols face à l'oxydation de l'air,
- la manipulation de petites quantités (déprotection finale sur ~10 mg) qui force à relativiser les rendements obtenus.

D'une façon générale, ces limitations sont liées à la manipulation de thiols, d'entités de hauts poids moléculaires, et à l'utilisation d'un PEG commercial monodisperse coûteux (N₃-PEG_{1,6K}-NH₂).

III. CAC DE L'AMPHIPHILE MONOCATIONIQUE ET PERFLUOROALKYLE DIMERISABLE

La concentration d'agrégation critique (cac) est un paramètre important dans le cadre d'une stratégie de condensation monomoléculaire de l'ADN, qui requiert l'utilisation des agents de compaction à des concentrations inférieures ou proches de leur cac. D'une façon générale, la cac d'un détergent augmente avec le nombre de charges cationiques, et diminue avec l'hydrophobie de la chaîne apolaire. La cac de l'amphiphile F₄C₁₀-Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** utilisé pour condenser l'ADN, a été mesurée par une méthode basée sur la fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) en présence de concentrations croissantes en détergent.⁸¹ La mesure a été faite en milieu HEPES (20 mM, pH 7,4, ~25°C) et en présence de DTT (10 mM) pour éviter l'oxydation des résidus cystéine, comme décrit précédemment.³² En effet, sans DTT, nous avons observé des mesures faussées probablement par une oligomérisation partielle des monomères soufrés.

Ainsi, nous avons trouvé une cac de 91 μM pour l'amphiphile **13** (Figure 27). D'après la littérature, cette valeur est du même ordre de grandeur que la cac du composé N-F₄C₁₀CystSperlin (85 μM) qui contient une tête basée sur la spermine linéaire, et inférieure à celle du composé F₄C₁₁Sperbr (130

μM) qui contient une tête basée sur la spermine branchée.³² Or d'un point de vue structural, $\text{F}_4\text{C}_{10}^-$ -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** ne diffère de ces amphiphiles perfluoroalkylés que par la partie polaire. De ce fait, les valeurs observées indiquent que la tête polaire TEONH_3^+ présente une hydrophilie similaire à une spermine tricationique linéaire (Sperlin), et moins prononcée qu'une spermine branchée tétracationique (Sperbr). Par ailleurs, si l'on compare avec l'analogue basé sur une tête ornithine $\text{C}_{14}\text{CystOrn}$ ($45 \mu\text{M}$),⁷² l'augmentation de l'hydrophobie due au remplacement de la chaîne hydrocarbonée $\text{H}(\text{CH}_2)_{14}$ par une chaîne perfluoroalkylée $\text{F}(\text{CF}_2)_4(\text{CH}_2)_{10}$ semble compensée par la plus grande hydrophilie de TEONH_3^+ par rapport à la tête polaire dicationique de type ornithine. Notons que la contribution de $\text{F}(\text{CF}_2)_4(\text{CH}_2)_{10}$ au processus de micellisation est équivalente à une chaîne hydrocarbonée $\text{H}(\text{CH}_2)_{16}$ (1 CF_2 compte pour $\sim 1,5 \text{ CH}_2$).

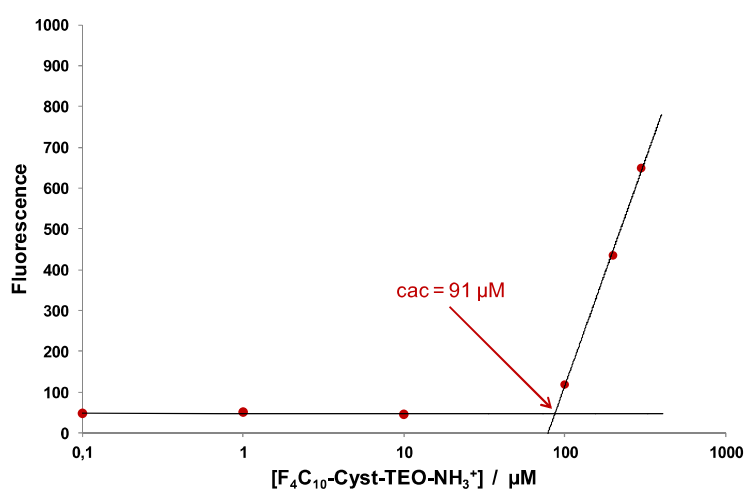


Figure 27 : Détermination de la cac de l'amphiphile F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+

La cac du composé formé après oligomérisation sur l'ADN est aussi importante dans le sens où une cac plus basse procurera au système une plus grande stabilité. Nous avons ainsi tenté de mesurer la cac des composés résultant de l'oxydation des cystéines. Malheureusement, la technique utilisée n'a pas permis d'accéder à des résultats cohérents, les cac étant très probablement inférieure à la limite de détection de la méthode ($1 \mu\text{M}$). Ces résultats sont en phase avec ceux rapportés précédemment³² et gagent que ces composés doivent permettre de déplacer l'équilibre vers l'obtention des NPs après oxydation de leur fonction thiol.

Les conditions de condensation monomoléculaire (sous la cac de l'agent de compaction) sont maintenues pour des rapports N/P ≤ 6 avec des formulations à $15 \mu\text{M}$ en ADN. Ainsi, les études physico-chimiques et les expériences de transfection *in vitro* jusqu'à N/P 5 ont pu être réalisées en conditions de condensation monomoléculaire de l'ADN (excepté les gels d'électrophorèse qui nécessitent des concentrations de l'ordre de $180 \mu\text{M}$ en ADN pour être visualisés).

IV. STABILITE DES AMPHIPHILES EN MILIEU HCL (TEST DPH)

L'instabilité du groupement sulfhydryle des résidus cystéine face à l'oxydation de l'air représente un inconvénient majeur à leur utilisation au laboratoire. L'amphiphile mono-cystéine F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** conduit par oxydation du résidu soufré au lipide correspondant. Le maintien des composés sous leur forme monomérique est donc primordial pour la formulation de nanoparticules monomoléculaires en ADN. Néanmoins, ils se sont révélés instables en milieu tamponné HEPES dégazé, c'est-à-dire à pH 7,4, d'où la nécessité d'effectuer les mesures de cac en conditions réductrices (DTT). Nous avons alors envisagé de préparer nos solutions stocks de détergents en milieu acide (HCl à 1 mM, pH = 3), prêtes à l'emploi pour les tests physico-chimiques et *in vitro* sur cellules. Ceci devrait limiter la réoxydation dont la vitesse dépend du pH. Pour vérifier la stabilité du composé **13** dans ces conditions, nous avons réalisé un suivi de la concentration en groupements sulfhydryles au cours du temps grâce au test quantitatif d'Ellman.⁸² Cette technique est basée sur l'utilisation de l'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB qui réagit stœchiométriquement avec les thiols en libérant du 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB), possédant un maximum d'absorption à 412 nm.

Pratiquement, après réduction des motifs cystéine grâce à la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP)⁸³ immobilisée sur support agarose (Thermo Scientific™ Pierce™), l'amphiphile **13** a été placé en milieu HCl 1 mM dégazé, puis l'absorbance des solutions a été mesurée régulièrement sur une période de trois semaines. Le taux de groupements sulfhydryles libres est resté constant dans l'intervalle de temps considéré, déterminé à environ 65% pour le composé mono-cystéine **13**, contre 88% pour la L-cystéine commerciale utilisée comme contrôle. La différence étant probablement liée à leur capacité d'auto-association.

Suite à ces résultats, les conjugués pegylés perfluoroalkylés dimérisables F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₁)**, F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₁)** et F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)**, utilisés pour la fonctionnalisation des complexes d'ADN, ont également été réduits sur TCEP immobilisé sur gel puis conservés au congélateur sous la forme de solutions stock en milieu HCl 1 mM.

V. FORMULATION DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE DERIVES CYSTEINE

D'une façon générale, les complexes d'ADN sont préparés au rapport N/P souhaité par addition d'une solution stock de détergent cationique perfluoroalkylé dans HCl à 1 mM dégazée, à une solution d'ADN plasmidique (pTG11236, cf. caractéristiques **chapitre II, paragraphe III.1**) dans l'HEPES (20 mM, pH = 7,4). La suspension est agitée à température ambiante pendant 12 h pour favoriser l'oligomérisation. En ce qui concerne les NPs fonctionnalisées, celles-ci sont formulées par ajouts successifs des détergents puis des conjugués pegylés perfluoroalkylés (solution stock dans HCl 1mM) sur l'ADN, suivi d'une agitation à température ambiante pendant 12 h. Les protocoles précis sont décrits dans la partie expérimentale (**partie III, paragraphe IV**).

VI. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE DERIVES CYSTEINE

Nous avons étudié les caractéristiques physiques des complexes d'ADN formulés à partir de l'amphiphile F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** avec ou sans fonctionnalisation de surface par le conjugué modèle F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)**. Il s'agit de déterminer leur état de compaction, leur intégrité, leur taille et leur potentiel zêta afin d'évaluer :

- (i) la capacité de l'amphiphile monocationique et perfluoroalkylé dimérisable **13** à condenser l'ADN en une population de particules stables et de petites tailles,
- (ii) la capacité du conjugué pegylé perfluoroalkylé dimérisable **24b(c₁)**, utilisé en co-formulation avec **13**, à fonctionnaliser la surface des particules.

VI.1 CONDENSATION DE L'ADN PAR L'AMPHIPHILE MONOCATIONIQUE ET PERFLUOROALKYLE DIMERISABLE

VI.1.1 EVALUATION DU RETARD SUR GEL PAR ELECTROPHORESE

La capacité du composé F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** à compacter l'ADN a été évaluée par retard sur gel d'électrophorèse. Les complexes ont été formulés à différents rapports N/P 1, 2 et 5. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 28** ci-dessous.



Figure 28 : Gel d'agarose des complexes ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEG- NH_3^+ à N/P 1, 2 et 5

L'amphiphile F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** complexe efficacement l'ADN dès N/P 2 (disparition des bandes correspondant aux formes libres relâchée et superenroulée du plasmide). Cependant, bien que totalement compacté, l'ADN reste accessible à ce rapport de charge (puits légèrement illuminé) tandis qu'il semble totalement protégé à N/P 5. D'une façon plus générale, les complexes restent au niveau des puits et ne migrent pas dans le gel, adoptant un comportement similaire aux lipoplexes et polyplexes cationiques conventionnels.

VI.1.2 EXPERIENCE D'EXCLUSION DU BROMURE D'ETHIDIUM

Pour évaluer l'affinité de l'agent de compaction **13** pour l'ADN en fonction de son état d'oxydation, nous avons déterminé sa constante d'association apparente (K^*_A) par expérience d'exclusion du bromure d'éthidium. Après marquage de l'ADN au BET, les complexes ont été formulés avec l'amphiphile F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** (N/P 0,1-10). Une expérience a aussi été réalisée avec les complexes ADN/**13** en présence de dithiothréitol (10 mM) pour assurer une totale réduction des ponts disulfure, et mettre en avant le processus de dimérisation. Les courbes de dosage sont données dans la **Figure 29** ci-après.

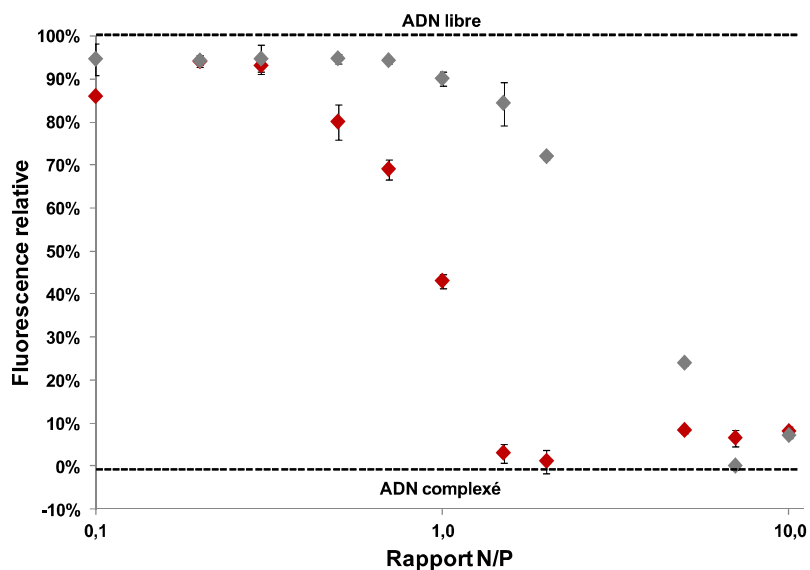


Figure 31 : Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium à 25°C pour les complexes ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ avec (◆) et sans (◆) 10 mM de DTT

Nous avons pu estimer la constante d'association apparente de l'amphiphile **13** pour l'ADN grâce à l'**Equation (2)** (**chapitre II, paragraphe III.4.2.1**). Nous avons $K^*_{A1} = 50 \mu M$ pour le dérivé F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** en conditions réductrices, et $K^*_{A2} = 5,9 \mu M$ sans DTT. Ainsi, la totale réduction des ponts disulfure montre bien un impact sur la stabilité des complexes, en diminuant l'affinité de l'amphiphile **13** pour l'ADN (~8 fois). Cela met en avant de façon indirecte la dimérisation du composé mono-cystéine **13** sur la matrice ADN. D'après cette étude, l'ADN est totalement condensé à partir de N/P 1,5.

VI.1.3 MESURE DE TAILLE ET DE POTENTIEL ZETA

Pour vérifier l'aptitude de l'amphiphile dimérisable à condenser l'ADN de façon monomoléculaire en formant des colloïdes stables, nous avons réalisé des mesures de taille et de potentiel zêta des complexes ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ à N/P 2, 5 et 10. Il est à noter qu'avec nos conditions opératoires (15 μM en ADN), seul le rapport N/P 10 ne permet pas de formuler sous la cac de l'agent compactant et donc d'être dans des conditions favorables pour une condensation strictement

monomoléculaire. Par rapport à la taille du plasmide utilisé, les NPs seront qualifiées de monomoléculaires en ADN pour une population monodisperse de NPs de l'ordre de 35 nm.⁷²

Notons qu'en DLS, l'indice de polydispersité (Pdl), qui donne une estimation de la largeur de la distribution des tailles, nous permet d'appréhender l'hétérogénéité de la distribution en taille des populations :

$$0,1 < \text{Pdl} < 1 \text{ avec}$$

- **Pdl ≤ 0,1** : population très monodisperse
- **Pdl ≥ 0,7** : population très polydisperse

Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Taille et potentiel zêta des NPs à base de l'agent F₄C₁₀-Cyst-TEG-NH₃⁺

Amphiphile	N/P	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	Indice de polydispersité (Pdl)
13	2	59 ± 2	-43,3 ± 0,4	0,28 ± 0,03
	5	53 ± 2	-44,0 ± 0,6	0,23 ± 0,00
	10	51 ± 2	+37,0 ± 0,6	0,22 ± 0,03

Les résultats obtenus sont très reproductibles et montrent que le composé **13** permet de condenser l'ADN en une population faiblement polydisperse (Pdl~0,25) de NPs de 50-60 nm (quasi-monomoléculaires) même à des rapports de charge où la cac est dépassée. Ces résultats sont confirmés par les images de TEM (cf. **paragraphe VI.2.4**). Jusqu'à N/P 5, le potentiel de surface reste assez négatif (~-44 mV), ce qui est un gage de la stabilité du colloïde par répulsions électrostatiques. Les conditions anioniques ne sont ici pas favorables à une endocytose par voie non spécifique. Il est surprenant de noter que les formulations au rapport N/P 5 présentent des potentiels zêta négatifs alors que les gels d'électrophorèse semblent indiquer une compaction et une inaccessibilité totale de l'ADN. La taille des NPs obtenues avec **13** reste inchangée à des rapports N/P plus grands. Pour autant, avec un potentiel de surface très positif à N/P 10, le système, également stabilisé par effet électrostatique, devient alors théoriquement plus apte à transfecter des cellules *in vitro*. De façon très surprenante, ces résultats tranchent singulièrement par rapport à ceux obtenus par l'équipe dans ses études précédentes. En effet, ici l'inversion de potentiel zêta a lieu entre les rapports N/P 5 et 10 tandis que cette même inversion se produisait entre les rapports N/P 2,5 et 5 auparavant. Une explication possible pourrait être liée à une plus grande maîtrise dans le maintien de la forme réduite thiol avec le protocole appliqué ici (passage sur la résine phosphine puis conservation des solutions stock dans HCl 1mM). Ainsi, à masse égale d'agents de compaction, la condensation des NPs d'ADN nécessiterait plus de composés dans le cas où la forme réduite est majoritaire par rapport à son dimère. L'équilibre de répartition entre les formes condensées ou non sur l'ADN s'en trouverait donc déplacé à cause des différences de solubilité liées aux deux formes.

VI.2 FONCTIONNALISATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES D'ADN

Le second objectif de cette étude physico-chimique a été d'évaluer la capacité des conjugués pegylés perfluoroalkylés dimérisables, utilisés en co-formulation avec le détergent, à fonctionnaliser la surface des complexes d'ADN. Pour économiser les conjugués PEG_{1,6K}-DLC8-AS F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₁)** et F₄C₁₀-Cyst-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₁)**, obtenus en faible quantité à partir du N₃-PEG_{1,6K}-NH₂ coûteux, nous avons réalisé cette étude avec le composé acétylé modèle F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)**.

VI.2.1 EVALUATION DE L'INTEGRITE DES NANOPARTICULES APRES FONCTIONNALISATION

Une expérience de retard sur gel a été effectuée pour s'assurer que la fonctionnalisation ne nuisait pas à l'intégrité des complexes. Les virus synthétiques modèles ont ainsi été formulés à partir du composé F₄C₁₀-Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** à N/P 2, utilisé en co-formulation avec 0 à 10 mol% de conjugué F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** par rapport au détergent.

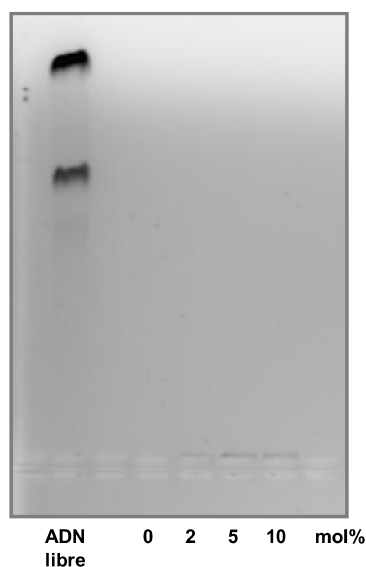


Figure 30 : Gel d'agarose des complexes ADN/F₄C₁₀-Cyst-TEG-NH₃⁺ à N/P 2 fonctionnalisés avec F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) à 0, 2, 5 ou 10 mol% (vs détergent)

Les bandes **2-10 mol%** du gel ci-dessus (**Figure 30**) montrent une augmentation graduelle de l'illumination des puits avec l'utilisation de concentrations croissantes en composé F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)**. L'ADN demeure totalement complexé mais devient plus accessible au BET. Ainsi, l'addition du conjugué pegylé semble déstabiliser quelque peu les complexes d'ADN. D'après ces résultats, les conditions les moins favorables sont obtenues avec des quantités de conjugués ≥ 5 mol%.

VI.2.2 EXPERIENCE D'EXCLUSION DU BROMURE D'ETHIDIUM

Pour quantifier l'impact de l'addition du conjugué pegylé F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** dans les formulations, nous avons effectué une expérience de spectrofluorimétrie basée sur l'exclusion du

bromure d'éthidium. Après marquage de l'ADN au BET, les complexes ont été formulés à partir du composé F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** à N/P 1, utilisé en co-formulation avec 0 à 10 mol% de conjugué **24b(c₁)** par rapport au détergent. Nous avons choisi de travailler au rapport de charge N/P 1 pour avoir ~50% d'ADN libre et mieux appréhender l'éventuelle stabilisation ou déstabilisation du système. Les résultats sont donnés dans la **Figure 31** ci-après.

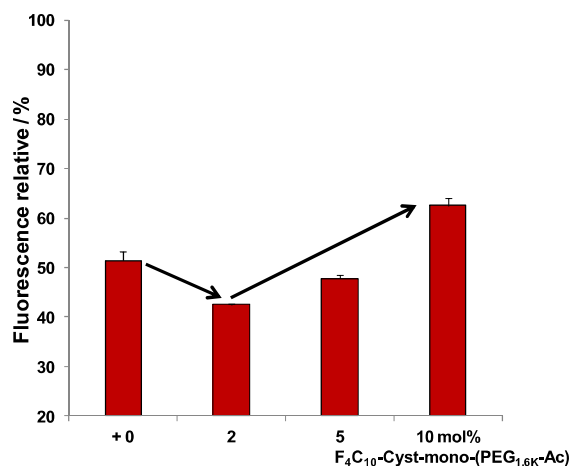


Figure 31 : Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium à 25°C pour les complexes ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ à N/P 1 avec F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) à 0, 2, 5 ou 10 mol% (vs détergent)

Ainsi, le conjugué pegylé a bel et bien un impact sur les complexes ADN/**13**. En effet, l'addition de 2 mol% de F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** abaisse d'environ 10% l'intensité relative de fluorescence du BET intercalé. Il semble donc dans un premier temps contribuer à stabiliser la formulation (on passe de 50% d'intensité relative à ~40%). Puis l'effet commence à s'inverser à partir de 5 mol%. On note cependant que, par rapport aux conditions initiales, l'effet global demeure stabilisant (on reste sous les 50% d'intensité). Ce n'est qu'à partir de 10 mol% où l'on a réellement une déstabilisation puisque l'intensité relative de fluorescence augmente de 15% par rapport aux conditions initiales.

Cette expérience dégage donc les taux à 2 et 5 mol% en conjugués pegylés comme étant les meilleurs candidats à la fonctionnalisation.

VI.2.3 MESURE DE TAILLE ET DE POTENTIEL ZETA

Pour terminer sur ce processus de fonctionnalisation, nous avons formulé des complexes ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ à N/P 2 et 5, avec 0, 1, 2 et 5 mol% de conjugué F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** par rapport au détergent, et analysé le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta des formulations par DLS et zétamétrie. Les résultats sont résumés dans la **Figure 32** ci-après.

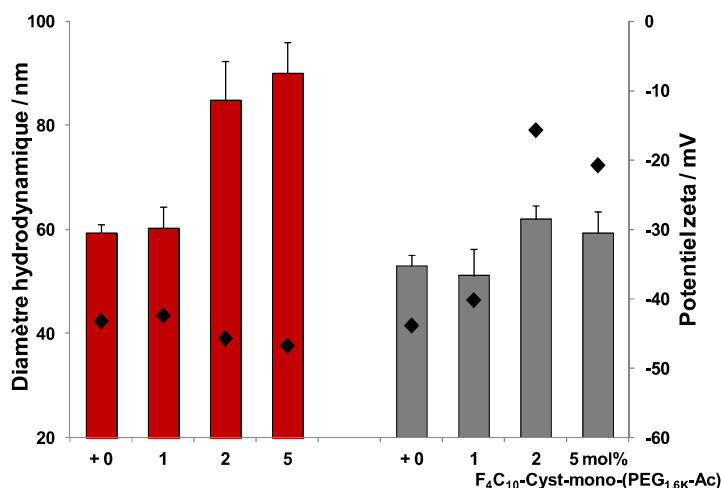


Figure 32 : Potentiel zêta (losanges) et diamètre hydrodynamique (barres) des complexes ADN/F₄C₁₀-Cyst-TEO-NH₃⁺ à N/P 2 (■) et 5 (■) avec F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) à 0, 1, 2 ou 5 mol% (vs détergent)

D'après les résultats obtenus, la fonctionnalisation a un impact non négligeable sur la taille des particules formées. En effet, le diamètre hydrodynamique des NPs décorées à N/P 2 augmente à hauteur de 20 nm environ dès l'ajout de 2 mol% du conjugué pegylé, puis n'évolue pratiquement plus avec 5 mol%. Les données concernant les NPs à base de F₄C₁₀-Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** à N/P 5 montrent une augmentation du diamètre hydrodynamique entre 1 et 2 mol% de conjugué pegylé moins marquée (+ 10 nm). Globalement, ceci rend compte d'une fonctionnalisation efficace des complexes par le conjugué F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** dans cette zone d'utilisation. L'espaceur PEG 1,6 kDa semble alors suffisamment long pour induire une augmentation de taille significative des complexes, ce qui est généralement observé avec des PEG 5 kDa. Finalement, les indices de polydispersité (non présentés ici), qui fluctuent autour de 0,25, confirment l'obtention de populations qui demeurent malgré tout faiblement polydisperses au rapport N/P 2. A N/P 5, les NPs fonctionnalisées avec 5 mol% de conjugué pegylé sont plus hétérogènes en termes de distribution (Pdl 0,42).

En ce qui concerne les potentiels zêta, la fonctionnalisation n'a un impact significatif qu'au rapport N/P 5. En effet, le potentiel zêta diminue de plus de la moitié dès l'ajout de 2 mol% de conjugué (-16 mV), puis stagne ensuite à 5 mol% (-21 mV) avec même une légère remontée comme observée précédemment en spectrofluorimétrie. Ceci témoigne d'une fonctionnalisation efficace par le composé F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)** puisque les PEG en surface masquent la charge négative des NPs nues. Les complexes ainsi fonctionnalisés restent toutefois chargés négativement, et ne sont donc *a priori* pas de bons candidats à une transfection des cellules *in vitro*. La situation concernant le rapport N/P 2 est moins évidente puisque la quantité ajoutée (2 ou 5 mol%) de conjugué n'a pas un impact suffisant pour être discriminée par une différence de mobilité électrophorétique, même si la fonctionnalisation doit être effective aux vues des résultats de l'expérience menée par spectrofluorimétrie.

VI.2.4 MORPHOLOGIE DES COMPLEXES

Afin d'analyser la morphologie des complexes et de mesurer leur taille par MET, nous avons formulé des NPs à base de F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** nues, ou fonctionnalisées avec 2 mol% du conjugué pegylé dimérisable F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)**. Les photos obtenues sont données dans la **Figure 33** ci-dessous.

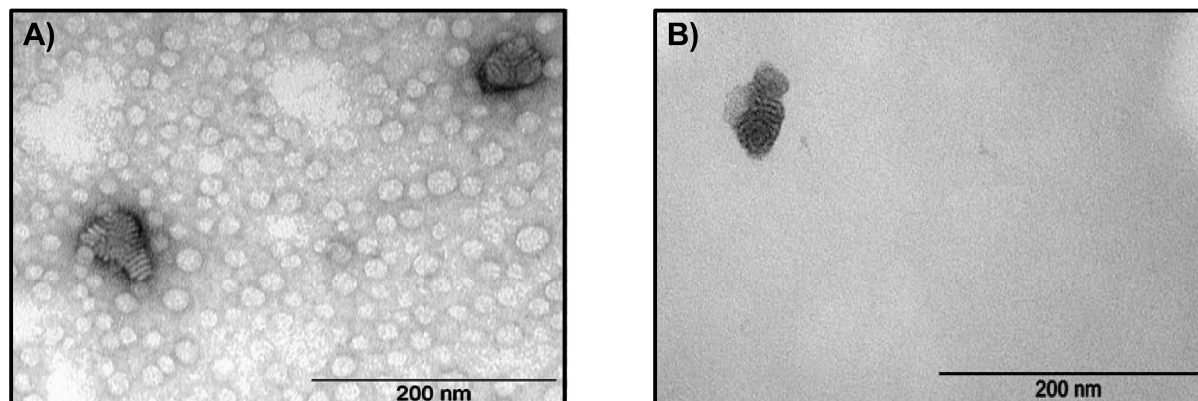


Figure 33 : Microscopie Electronique en Transmission des NPs ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ à N/P 2
A) nues, et **B)** avec 2 mol% de F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac)

Ainsi, nous avons mesuré un diamètre de 58 ± 8 nm pour les NPs nues, et un diamètre de 61 ± 12 nm pour les NPs fonctionnalisées avec les conjugués pegylés. Les tailles obtenues pour les NPs nues sont en accord avec les résultats prédits par DLS. Pour autant, cette technique ne permet pas de mettre en avant une différence de taille avant et après fonctionnalisation, probablement à cause de l'étape de séchage nécessaire à la préparation de l'échantillon. Par ailleurs, de façon similaire aux lipospermines préalablement développées, les composés forment des mésophases tubulaires où l'on devine l'ADN enroulé sur les images. Finalement, l'ensemble des photos confirme tout de même une certaine homogénéité en termes de distribution en taille des formulations (faible polydispersité), même si peu de particules sont présentes sur chacune d'elles étant donné la grande dilution des échantillons (15 μ M en ADN).

VI.3 CONCLUSION SUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE DERIVES CYSTEINE

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des complexes d'ADN à base de résidus cystéine nous a permis d'appréhender leur potentiel en tant qu'agents compactant d'ADN et donc comme vecteurs de transfert de gènes. L'amphiphile mono-cystéine F_4C_{10} -Cyst-TEG- NH_3^+ **13** conduit, selon les conditions opératoires, à la formation de nanoparticules d'ADN anioniques ou cationiques et quasi-monomoléculaires (faiblement polydisperses et de l'ordre de 50-60 nm), après oligomérisation des thiols sur la matrice ADN. Concernant la fonctionnalisation par le conjugué modèle F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **24b(c₁)**, celle-ci semble basée sur l'oligomérisation des thiols sur l'ADN en synergie avec l'effet hydrophobe des chaînes fluorées. D'après les résultats, le processus est efficace dès l'ajout de 2 mol% du conjugué pegylé sur les NPs ADN/**13**.

Aux vues des résultats obtenus, les formulations les plus probantes (taille, stabilité, polydispersité, fonctionnalisation) sont *a priori* celles à base de F_4C_{10} -Cyst-TEG- NH_3^+ **13** à N/P 5 avec 2 ou 5 mol% de conjugué pegylé. Pour autant, les complexes formés, même décorés, restent chargés négativement dans ces conditions ce qui devrait inhiber leur internalisation cellulaire lors d'expériences de transfection *in vitro*.

VII. ETUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES NANOPARTICULES D'ADN A BASE DE RESIDUS CYSTEINE

VII.1 TRANSFECTION *IN VITRO* DES COMPLEXES DECORES

Nous avons évalué l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des NPs formulées avec F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** à N/P 2 et 5 mais aussi à N/P 10 (pour favoriser l'endocytose), avec 0, 2 ou 5 mol% de F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₁)** ou F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₁)** (vs détergent). Les expériences ont été réalisées sur lignées cellulaires HeLa, avec des polyplexes de JetPEI à N/P 10 et l'ADN nu comme contrôles positif et négatif, respectivement. Les résultats sont représentés dans la **Figure 34** ci-dessous.

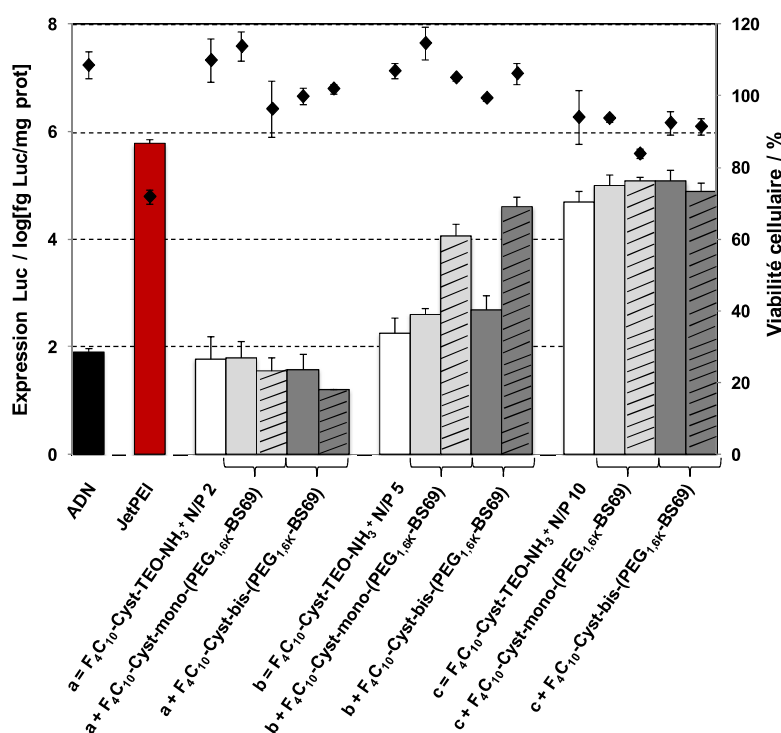


Figure 34 : Efficacité de transfection (barres) et viabilité cellulaire (losanges) sur cellules HeLa des NPs d'ADN formulées avec F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ à N/P 2, 5 et 10, nues (□) ou avec 2 mol% (uni) ou 5 mol% (hachures) de F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) (▨) ou F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) (■) (vs détergent) ;
contrôles : JetPEI à N/P 10 et ADN

Comme prévu, les NPs nues (i.e. non fonctionnalisées) aux rapports de charge N/P 2 ou 5 ne transfectent pas mieux que l'ADN non vectorisé. Dans ces conditions, elles portent une charge de surface négative (-44 mV) qui inhibe leur pénétration à travers la membrane plasmique riche en protéines anioniques. A N/P 10, le potentiel zêta redevient très positif (+37 mV) et facilite

l'internalisation des complexes par voie d'endocytose non spécifique, ce qui explique la nette amélioration du niveau de transfection (~800 fois). Concernant la fonctionnalisation de surface par les séquences DLC8-AS, on peut voir qu'aux rapports de charge N/P extrêmes 2 et 10, quelles que soient les conditions de formulation utilisées, le greffage des DLC8-AS basées sur la séquence BS69, sous leur forme mono- ou dimériques, n'a pas d'impact sur les résultats. On peut penser qu'au plus faible rapport de charge N/P 2, les NPs ne présentent pas une stabilité suffisante pour remplir un rôle quelconque dès lors qu'elles se trouvent dans des conditions physiologiques *in vitro*. Le rapport de charge le plus élevé N/P 10, gomme quant à lui des différences probablement trop subtiles pour se démarquer. Il est probable que la plus grande polydispersité du système alliée aux interactions non spécifiques occasionnées par leur caractère cationique aboutissent à une prise en charge différente, plus classique à l'image des vecteurs cationiques non viraux habituellement utilisés.

Le rapport de charge intermédiaire N/P 5 par contre, rend compte d'un comportement *in vitro* des formulations différent et tout à fait singulier. Alors que les complexes nus, chargés négativement, ne transfectent que très peu, il est remarquable de noter que ces mêmes complexes, toujours négatifs mais décorés en surface par 5 mol% de ligands DLC8-AS, améliorent de façon très significative les résultats. Cependant, il ne semble pas y avoir d'effet lié à la bivalence dans ces résultats mais seulement un effet de concentration en conjugué. En effet, avec 2 mol% en conjugué, aucune des séquences (qu'elles soient monomériques ou dimériques en DLC8-AS) n'améliore la transfection de façon significative alors qu'avec un taux de 5 mol% de conjugués, la transfection augmente d'un facteur 80 avec le monomère de DLC8-AS et d'un facteur 250 avec son dimère. Cet effet « seuil » ressemble fortement à celui observé dans le cadre de l'étude des fluosphères fonctionnalisées où l'équipe avait déterminé que seulement 18% des NPs fonctionnalisées à 10% en DLC8-AS localisaient vers le noyau, tandis que la proportion grimpeait à 82% lorsque les NPs étaient décorées à 100%. Nous nous sommes alors interrogés sur la nature réelle de nos conjugués pegylés vis-à-vis de l'oxydation potentielle du résidu cystéine avant leur utilisation en co-formulation. Autrement dit, est-on en présence de thiols (et donc de mono- ou dimères de DLC8-AS) ou avons-nous à faire à un disulfure (auquel cas nous aurions des di- ou tétramères de DLC8-AS) ? Après vérification par le test d'Ellman, il nous est apparu que même après réduction sur TCEP immobilisé sur gel d'agarose et conservation dans HCl 1 mM, la forme réduite disparaît très rapidement (~24 h). Il apparaît donc qu'outre un effet lié à la concentration en conjugué, l'effet de multivalence énoncé dans notre hypothèse ne soit pas totalement exclu dans le processus impliqué ici. Ceci expliquerait la faible différence observée entre les formulations à 5 mol% en conjugués, qui présentent en réalité toutes deux un effet multivalent (di- et tétramère en DLC8-AS). L'amélioration globale de la fonctionnalisation avec cette stratégie par rapport à la première utilisée par l'équipe, qui s'est révélée inefficace avec un système similaire, peut être expliquée par deux points qui agissent probablement en synergie : (i) les conjugués pegylés portant les ligands DLC8-AS contiennent ici un résidu cystéine, contrairement à la stratégie précédente (simple ancre hydrophobe), ce qui crée une force motrice supplémentaire pour une fonctionnalisation homogène par dimérisation en disulfure; (ii) le PEG utilisé dans cette étude (1,6

kDa, 36 unités) est plus court que le précédent (5 kDa, ~114 unités), ce qui permet, en se basant simplement sur des considérations géométriques liées à leur volume respectif, d'en ajouter plus par unité de surface.

D'une façon générale, on note également que les profils de viabilité cellulaire des complexes, formulés à N/P 2 et 5, sont nettement plus favorables que ceux obtenus avec le JetPEI. On voit également que la mortalité des cellules traitées par nos formulations augmente à N/P 10.

Globalement ce résultat, même s'il ne remplit pas toutes les espérances, demeure en tout point remarquable si l'on tient compte des conditions non conventionnelles que nous avons utilisées : nature anionique des NPs, taille des nanostructures élaborées, haute dilution du gène (15 μ M). Il semble bel et bien qu'au rapport N/P 5 et dans les conditions de nos expériences, notre système présente des caractéristiques de virus synthétiques qui permettent d'effectuer, *in vitro*, un transfert de gènes à des concentrations très diluées en ADN. Malgré ces observations, l'efficacité de transfection demeure inférieure à celle observée lors de l'utilisation des polyplexes de JetPEI. Un facteur 16 fois est en effet observé en faveur du JetPEI par rapport à la meilleure de nos formulations (agent cationique + dimère).

VII.2 TRANSFECTION *IN VITRO* DES COMPLEXES EN PRESENCE D'UN INHIBITEUR DE MICROTUBULES

Afin de confirmer l'implication des microtubules dans le processus de transfection par les complexes ADN/ F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** à N/P 5 fonctionnalisés avec les conjugués mono- et bis-DLC8-AS, nous avons réalisé une expérience en présence de nocodazole. Ce dernier est un inhibiteur de la polymérisation microtubulaire entraînant la désagrégation du réseau de microtubules au sein des cellules traitées.⁸⁴ De ce fait, l'inhibition de ce réseau devrait avoir des conséquences dramatiques sur l'efficacité s'il est impliqué. Nous avons donc formulé puis testé des NPs à base de l'agent cationique **13** à N/P 5 avec 0, 2 ou 5 mol% de F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **24a(c₁)** ou F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **21(c₁)** (vs détergent). Les résultats de transfection avec et sans nocodazole sont présentés dans la **Figure 35** ci-après.

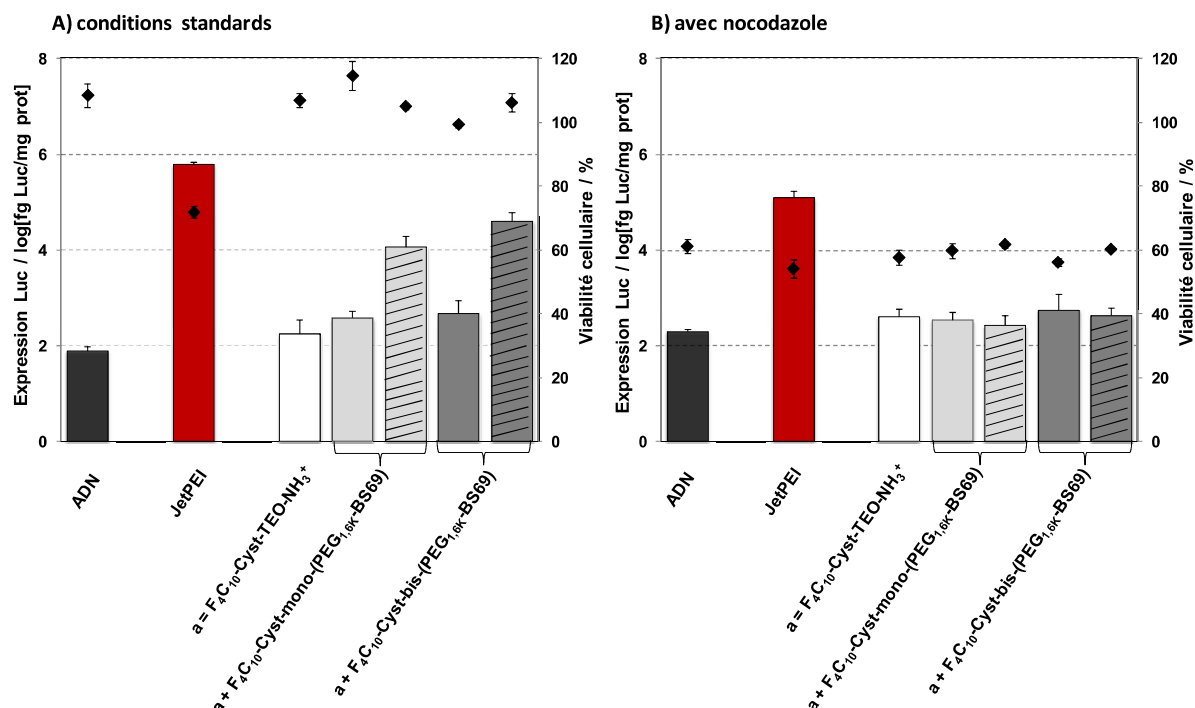


Figure 35 : Efficacité de transfection (barres) et viabilité cellulaire (losanges) sur cellules HeLa des NPs d'ADN formulées avec F₄C₁₀-Cyst-TEO-NH₃⁺ à N/P 5, nues (□) ou avec 2 mol% (uni) ou 5 mol% (hachures) de F₄C₁₀-Cyst-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) (■) ou F₄C₁₀-Cyst-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) (■) (vs détergent), en l'absence (A) ou en présence (B) de nocodazole ;
contrôles : JetPEI à N/P 10 et ADN

D'une façon remarquable, on constate qu'en présence de l'inhibiteur, l'efficacité des formulations à 5 mol% de conjugués est bien plus impactée que les autres et qu'elle est ramenée au niveau basal de transfection des NPs nues. Ainsi, les microtubules, et par voie de conséquence la dynéine, semblent tous deux bien impliqués dans le processus de transport des NPs fonctionnalisées au moyen des ligands des chaînes légères LC8. Il est intéressant de noter que les polyplexes de JetPEI semblent quand même impactés par la dépolymérisation des microtubules. Ce résultat n'est pas étonnant puisque des études ont montré que les endosomes de PEI pouvaient être pris en charge au niveau des microtubules.⁸⁵ Cependant, ce phénomène semble avoir lieu dans une moindre mesure, comme en atteste une diminution d'efficacité d'un peu moins d'un log comparée à environ 2 log dans le cas de nos formulations. Cela tendrait à prouver que le mécanisme de transport actif contribue pour une part plus importante au trafic intracellulaire de nos formulations fonctionnalisées. Par ailleurs, on peut également souligner que le nocodazole a un effet non négligeable sur la viabilité cellulaire qui diminue de façon drastique dans tous les cas.

VII.3 CONCLUSION SUR L'ETUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES NANOPARTICULES D'ADN A BASE DE RESIDUS CYSTEINE

L'amphiphile cationique dimérisable F₄C₁₀-Cyst-TEG-NH₃⁺ **13** a permis de former des NPs d'ADN homogènes, de petites tailles aux différents rapports N/P étudiés (2, 5 et 10). Les rapports N/P 2 et 5 permettent une condensation quasi-monomoléculaire en ADN (~50 nm de diamètre) avec

l'obtention de NPs négatives. Le rapport N/P 5 forme cependant des NPs dans lesquelles l'ADN est inaccessible au BET. Au rapport plus élevé N/P 10, les NPs restent de faibles tailles (~50 nm) mais présentent une charge positive. La fonctionnalisation de ces complexes par des conjugués pegylés modèles sans DLC8-AS s'est montrée effective dans une gamme de concentration autour de 2-5 mol% de l'agent compactant. L'évaluation de l'efficacité de transfection des NPs nues ou décorées par les conjugués pegylés DLC8-AS, qui se sont en fait révélés être les formes disulfure (présentant donc des di- ou tétramères de DLC8-AS), montre que seules les NPs négatives formulées à N/P 5 et décorées par 5 mol% de ligands multivalents basés sur BS69, ont un effet important sur le transfert de gènes tout en restant inférieures à la référence (polyplexes JetPEI). L'effet prépondérant semble être lié au taux de ligand de fonctionnalisation présent à la surface des NPs, mais l'effet multivalent ne peut être définitivement écarté aux vues des faibles taux de fonctionnalisation utilisés pour maintenir la stabilité des colloïdes. L'inhibition notable de la transfection de ces formulations par le nocodazole démontre un mécanisme faisant intervenir le réseau de microtubules et donc la dynéine. Il est cependant très surprenant que seules les NPs fonctionnalisées de charge de surface négative aient montré un effet. Est-ce dû aux différences en termes d'interactions non spécifiques entre les systèmes cationiques et anioniques ? Est-ce dû à des voies d'internalisation et/ou des biodégradabilités différentes ? Toutes ces questions sont pour l'instant sans réponse et nécessitent des expériences adaptées qui devront être menées dans le futur.

VIII. CONCLUSION SUR LE SYSTEME A BASE DE RESIDUS CYSTEINE

D'après les travaux préliminaires réalisés au laboratoire sur des fluosphères fonctionnalisées pour tirer partie du réseau de transport intracellulaire (MTs/Dynéine) (cf. **chapitre I, paragraphe III.1**), l'équipe a montré que les DLC8-AS pouvaient être de bons candidats pour augmenter la concentration périnucléaire de nanoparticules à condition d'avoir un grand nombre de ces séquences au niveau de leur surface.²⁵ Dans le cas de NPs de matière molle telles que des lipoplexes ou polyplexes d'ADN, de tels taux sont rédhibitoires à la stabilité des colloïdes. Une première tentative de fonctionnalisation par des conjugués pegylés contenant des DLC8-AS sur des NPs d'ADN de petites tailles formulées grâce à des amphiphiles cationiques à motifs cystéine s'est d'ailleurs soldée par un échec. Des études récentes ont par ailleurs montré que des séquences DLC8-AS, sous leur forme dimérisée, augmentent l'affinité vis-à-vis des chaînes légères LC8 de la dynéine. Les objectifs de ce travail ont consisté à améliorer notre système de NPs monomoléculaires en se basant sur l'hypothèse que l'utilisation de séquences dimériques de DLC8-AS pourrait compenser les faibles taux de fonctionnalisation requis. Dans ce cadre :

- (i) Nous avons synthétisé *via* une méthode efficace, alliant phase solide et chimie Click, des macromolécules complexes constituées d'amphiphiles à résidus cystéine et comportant des monomères ou dimères de conjugués PEG_{1.6K}-DLC8-AS visant la dynéine.

(ii) Nous avons montré qu'en présence d'ADN, la combinaison de ces amphiphiles à motifs cystéine, cationiques d'une part pour la compaction, ou comportant le conjugué modèle mono-(PEG_{1,6k}-Ac) d'autre part pour la fonctionnalisation, permettait d'obtenir de petites NPs d'ADN fonctionnalisées.

(iii) L'étude physico-chimique a guidé la formulation vers des NPs non conventionnelles dans le domaine (en termes de taille, de charge et de titre en ADN). L'évaluation de ces NPs d'ADN fonctionnalisées par des conjugués PEG_{1,6k}-DLC8-AS a permis de montrer que sous les conditions prédites par les expériences physico-chimiques, elles pouvaient se comporter comme des virus synthétiques. Dans ce cas, les nanovecteurs équipés de conjugués PEG_{1,6k}-DLC8-AS, permettent d'améliorer de façon significative l'efficacité de transfection, avec un mécanisme microtubule-dépendant qui laisse penser que le processus en action est bien celui visé. L'effet multivalent n'est pas mis en évidence de façon directe mais semble jouer un rôle, même si l'effet concentration demeure un facteur clé.

Toutefois, ces résultats bien qu'encourageants, restent malheureusement en deçà des niveaux de transfection atteints avec les complexes de JetPEI références et ne seront probablement pas transposables à des conditions *in vivo*, et ce malgré leur capacité à transférer à faibles titres à cause de la stabilité relative de ces systèmes dans de vrais organismes vivants.

CHAPITRE IV : FORMULATION DE NANOPARTICULES D'ADN FONCTIONNALISEES BASEES SUR DES DERIVES OCTAARGININE

La stratégie développée dans ce chapitre consiste à coupler des dimères de séquences DLC8-AS (BS69, cf. séquence **Tableau 4**) sur des complexes d'ADN formulés à partir d'un amphiphile perfluoroalkylé octaarginine. Comme évoqué précédemment (cf. **chapitre I, paragraphe VI.3**), les oligoarginines sont à la fois des agents de condensation efficaces de l'ADN grâce à leurs groupements guanidinium, et des agents de perméation de la membrane plasmique de par leurs propriétés pénétrantes (CPP).⁵⁸ Par ailleurs, l'attachement d'une entité hydrophobe sur la chaîne homoarginine a amélioré son efficacité de transfection.⁵⁹ Le processus de formulation est schématisé dans la **Figure 13** (**chapitre I, paragraphe VI.3**). Il consiste à co-formuler l'ADN avec le mélange d'un amphiphile perfluoroalkylé polycationique basé sur un résidu octaarginine, avec son conjugué bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS).

I. DESIGN DES MOLECULES A BASE D'OCTAARGININE ET DES CONTROLES

Les structures des composés utilisés pour la formulation des particules fonctionnalisées par les dimères de séquence BS69 sont données dans le **Tableau 9** ci-dessous.

Tableau 9 : Agent de compaction, conjugué pegylé bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) et contrôles

Détergent polycationique	$F_4C_{10}-Arg_8-CH_2CCH$ 36
Conjugués PEG polycationiques	$F_4C_{10}-Arg_8-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69)$ 41
	<p>(R = CH₃) $F_4C_{10}-Arg_8-mono-(PEG_{1,6K}-BS69)$ 38a (R = BS69) $F_4C_{10}-Arg_8-mono-(PEG_{1,6K}-Ac)$ 38b</p>

D'une façon générale, nous avons transposé la stratégie cystéine développée précédemment (cf. **chapitre III**) à un système polypeptidique. L'agent de compaction de l'ADN polycationique développé ici, F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36**, est constitué d'un résidu peptidique de type octaarginine lié à la chaîne perfluoroalkylée au niveau de son extrémité *N*-terminale et à la propargylamine au niveau de sa partie *C*-terminale. Ainsi, il peut également servir directement d'intermédiaire pour former, par chimie Click, les conjugués pegylés servant de contrôles : F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **37b** dont le PEG est terminé par un groupement acétyle, et F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **37a** fonctionnalisé par un monomère de PEG_{1,6K}-DLC8-AS, et non par un dimère. Pour ce qui est du conjugué pegylé dimérique, F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **40**, il est également dérivé de l'amphiphile perfluoroalkylé de l'octaarginine et porte un résidu acide aspartique modifié à son extrémité *C*-terminale pour pouvoir réaliser une double réaction de chimie Click. Ainsi, les charges cationiques présentes sur l'agent de condensation et sur les conjugués pegylés assurent des interactions fortes avec l'ADN, et la chaîne perfluoroalkylée favorise l'auto-association. Ici aussi l'espaceur utilisé est un PEG monodisperse de 1,6 kDa.

II. SYNTHÈSE DE L'AMPHIPHILE POLYCATIONIQUE ET DES CONJUGUES PEGYLES

La synthèse des précurseurs azotures N_3 -PEG_{1,6K}-BS69^D **14a** et N_3 -PEG_{1,6K}-NHAc **14b** a été donnée précédemment (**chapitre III, paragraphe II.2.1.1**).

La stratégie générale de synthèse suivie pour obtenir tous les dérivés octaarginine imaginés dans le cadre de cette approche est représentée dans le **Schéma 6** ci-après.

Tous les composés finaux (agent de condensation et conjugués pegylés) ont comme précurseur commun l'amphiphile perfluoroalkylé octaarginine **34** préalablement synthétisé sur support solide. De façon similaire à la stratégie envisagée pour l'obtention des dérivés cystéine (cf. **chapitre III**), l'approche comprend une réaction CuAAC pour coupler la partie polaire pegylée à la partie apolaire perfluoroalkylée.

Ainsi, le précurseur F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-OH **34** a été obtenu à partir d'une résine 2-Cl-Trt suivant une procédure Fmoc classique. Après couplage sur la résine du premier résidu arginine Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**31**) protégé sur son extrémité *N*-terminale et sur sa chaîne latérale par les groupements Fmoc et Pbf (pour 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl) respectivement, l'acide aminé est allongé en *N*-terminale par sept cycles successifs de déprotection/activation/couplage pour conduire à l'octaarginine protégée (**32**). Un dernier cycle appliqué à l'acide perfluoroalkylé $F-(CF_2)_4(CH_2)_{10}-COOH$ permet d'aboutir à l'octaarginine perfluoroalkylée (**33**) protégée sur les chaînes latérales peptidiques. Le clivage de la résine en conditions acides douces (CH_2Cl_2 /TFE/acide acétique 4:1:1) permet d'obtenir l'acide libre **34** totalement protégé avec 86% de rendement. Par la suite, le même schéma que celui appliqué lors de la stratégie cystéine peut être employé. L'acide **34** est couplé soit à la propargylamine pour préparer les conjugués pegylés contrôles monomériques par l'intermédiaire de l'alcyne **35** (73%), soit sur le dérivé aspartique bis-alcyne $H_2N-Asp(CH_2CCH)_2$ pour obtenir le nonapeptide bis-alcyne **39** (78%) servant à la synthèse des conjugués pegylés dimériques. Il est à noter que la déprotection des chaînes latérales des arginines en milieu TFA à partir du mono-alcyne **35** permet d'obtenir l'octaarginine perfluoroalkylée **36** qui servira d'agent de condensation.

Le mono-alcyne protégé **35** peut être engagé dans une réaction mono-Click avec N_3 -PEG_{1,6K}-BS69^p **14a** ou N_3 -PEG_{1,6K}-Ac **14b**, pour former les conjugués pegylés monomériques contrôles protégés F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69^p) **37a** (59%) et F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **37b** (71%), respectivement. La déprotection totale des acides aminés permet d'accéder aux conjugués F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a** (67%) et F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** (70%).

Parallèlement, la réaction double-Click entre le bis-alcyne protégé **39** avec N_3 -PEG_{1,6K}-BS69^p **14a** conduit au conjugué dimérique F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69^p) **40** (62%). Là aussi, une dernière étape de déprotection des acides aminés en milieu acide conduit au composé désiré F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **41** avec 86% de rendement.

Pour conclure, les macromolécules portant un monomère ou un dimère de séquences DLC8-AS ont été synthétisées avec succès malgré les nombreuses difficultés rencontrées, qui relèvent là aussi des étapes de purification et de caractérisation des composés. Les rendements finaux sont toutefois à relativiser étant donné les faibles quantités manipulées.

III. CAC DE L'AMPHIPHILE POLYCATIONIQUE OCTAARGININE PERFLUOROALKYLE

La cac de l'amphiphile polycationique F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36**, utilisé pour condenser l'ADN, a été mesurée en milieu HEPES (20 mM, pH 7,4, ~25°C) par la méthode précédemment décrite basée sur la fluorescence du DPH. Ainsi, nous avons trouvé une valeur de 75 μ M (**Figure 36**). Ce résultat est surprenant si l'on tient compte de la nature octacation du composé et que l'on compare avec son homologue cystéine F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** qui est monocationique et dont la cac a été mesurée à 91 μ M. Cependant, la nature très hydrophile de la tête triéthylène oxy dans ce dernier cas pourrait expliquer cet apparent paradoxe.

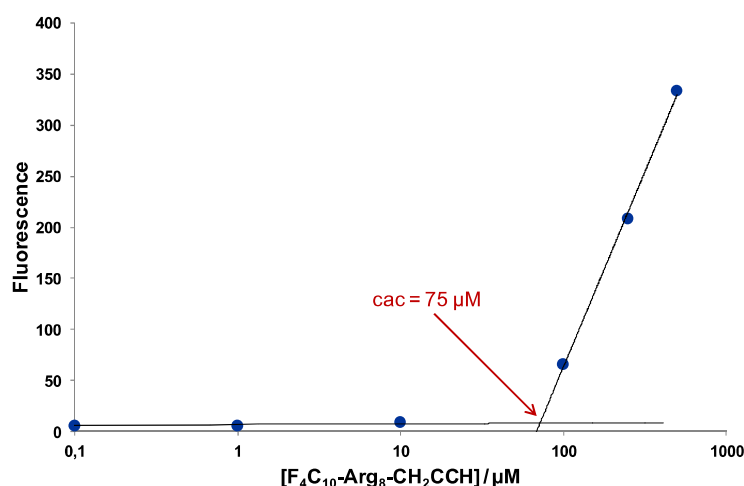


Figure 36 : Détermination de la cac De l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH

Ainsi, l'octaarginine perfluoroalkylée **36** est un bon candidat pour une condensation de l'ADN dans des conditions exemptes d'agrégation, à condition de maintenir l'excès de détergent cationique sous la cac. Tel est le cas pour toutes les formulations utilisées lors des études physico-chimiques et sur cellules, excepté les gels d'électrophorèse aux rapports de charge N/P 5 et 10. Ceci provient du fait qu'avec huit charges cationiques, à N/P équivalent, on utilise des concentrations huit fois inférieures à celle d'un monocationique.

IV. FORMULATION DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE DERIVES OCTAARGININE

D'une façon générale, les complexes d'ADN sont préparés au rapport N/P souhaité par addition d'une solution stock de l'amphiphile cationique perfluoroalkylé dans l'HEPES (20 mM, pH = 7,4), à une solution d'ADN plasmidique (pTG11236, cf. caractéristiques **chapitre II, paragraphe III.1**) également dans l'HEPES. La suspension est agitée à température ambiante pendant 30 min pour que l'équilibre s'établisse. En ce qui concerne les NPs fonctionnalisées, celles-ci sont formulées par l'ajout successif de l'amphiphile polycationique puis des conjugués pegylés perfluoroalkylés (solutions stock dans l'HEPES) sur l'ADN, suivi d'une agitation à température ambiante pendant 30 min. Les protocoles sont décrits dans la partie expérimentale (**partie III, paragraphe IV**).

V. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE DERIVES OCTAARGININE

Comme dans les études précédentes, les caractéristiques physiques des complexes d'ADN formulés à partir de l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36**, avec ou sans fonctionnalisation de surface par le conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** ont été étudiées. Il s'agit de déterminer leur intégrité, leur taille et leur potentiel zêta afin d'évaluer :

- (i) la capacité de l'agent polycationique et perfluoroalkylé **36** à condenser l'ADN pour conduire à des populations de particules stables, monodisperses et de petites tailles,
- (ii) la capacité du conjugué pegylé polycationique et perfluoroalkylé **38b**, utilisé en co-formulation avec l'amphiphile **36**, à fonctionnaliser la surface des particules.

V.1 CONDENSATION DE L'ADN EN CONDITIONS MONOMOLECULAIRES

V.1.1 EVALUATION DE L'ETAT DE COMPACTION DE L'ADN

La capacité du composé F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** à compacter l'ADN a été évaluée par retard sur gel d'électrophorèse. Les complexes ont été formulés à différents rapports N/P (1, 1,5, 2, 5 et 10). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 37** ci-dessous.

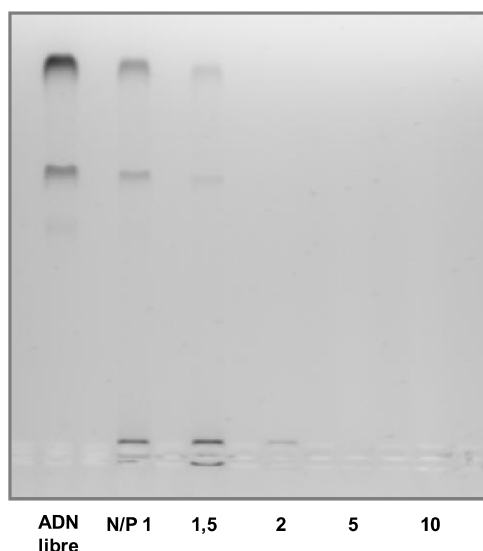


Figure 37 : Gel d'agarose des complexes ADN/ F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH à N/P 1, 1,5, 2, 5 et 10

La lecture du gel indique que le composé **36** condense efficacement l'ADN dès N/P 2 (disparition des bandes caractéristiques du plasmide). Toutefois, dans ces conditions, le puits demeure légèrement éclairé ce qui signifie que l'ADN reste en partie accessible à l'intercalation du BET. A N/P 5 et 10, l'ADN est par contre totalement complexé et inaccessible au BET.

V.1.2 EXPERIENCE D'EXCLUSION DU BROMURE D'ETHIDIUM

Afin d'évaluer l'affinité de l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** pour l'ADN, nous avons déterminé sa constante d'association apparente (K^*_A) par expérience d'exclusion du BET. Ainsi, l'ADN plasmidique

a tout d'abord été marqué avec du BET, puis les complexes ont été formulés avec le composé **36** (N/P 0,1-8). Les résultats sont donnés ci-dessous (**Figure 38**) en intensité relative de fluorescence [%] en fonction du rapport N/P. L'intensité de fluorescence (600 nm) a été mesurée après excitation du BET à 520 nm, puis transformée en intensité relative de fluorescence à partir de l'**Equation (1)** donnée précédemment (**chapitre II, paragraphe III.4.2.1**).

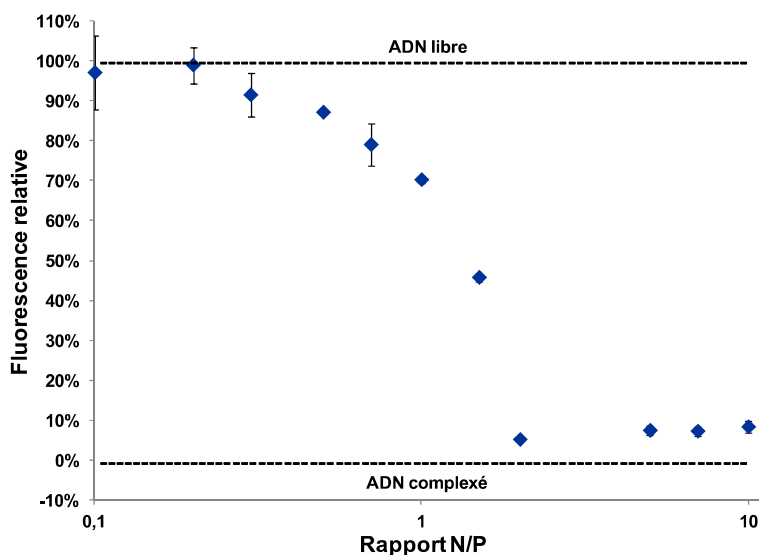


Figure 38 : Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium à 25°C pour les complexes ADN/ F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH

Ainsi, on observe une diminution de l'intensité relative de fluorescence jusqu'au rapport N/P 2 suivie d'un plateau, qui montre que l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** complexe efficacement l'ADN dès N/P 2. En estimant l'hydrophobie d'un groupement CF₂ équivalente à 1,5 fois celle d'un groupement CH₂, nous pouvons raisonnablement comparer notre composé **36** avec le conjugué stéaryl-Arg₈ développé par Futaki et *al.*⁵⁹ Ces derniers ont obtenu des résultats équivalents aux nôtres, en montrant par exclusion de fluorescence que le conjugué octaarginine stéarylé condensait efficacement un plasmide PGV-C2 (5,2 kbp) à partir de N/P 2.

Par ailleurs, cette courbe de dosage permet également d'estimer la constante d'association apparente $K^*_A = 2,6 \mu M$, pour le dérivé **36**. Cette constante d'affinité est la plus faible des agents de condensation que nous avons étudiés pendant cette thèse, ce qui confirme qu'une octaarginine amphiphile possède une grande affinité vis-à-vis de l'ADN.

V.1.3 MESURE DE TAILLE ET DE POTENTIEL ZETA

Nous avons ensuite évalué le diamètre hydrodynamique ainsi que le potentiel zêta des NPs d'ADN formées par l'octaarginine perfluoroalkylée F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** formulées à différents rapports N/P (1-5) par DLS et zétamétrie. Dans tous les cas, l'amphiphile est utilisé sous sa cac. Les mesures ont été faites environ 30 min après la formulation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Taille et potentiel zêta des NPs à base de l'amphiphile F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH

Amphiphile	N/P	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	Indice de polydispersité (Pdl)
F ₄ C ₁₀ -Arg ₈ -CH ₂ CCH	1	95 ± 3	-34,1 ± 1,0	0,36 ± 0,01
	1,5	85 ± 3	-41,3 ± 0,3	0,24 ± 0,04
	2	163 ± 4	-38,2 ± 1,0	0,38 ± 0,03
	3	1731 ± 222,8	-3,6 ± 0,4	1,00 (max)
	5	4839 ± 196	13,5 ± 0,9	1,00 (max)

On peut voir tout d'abord que les NPs sont plus grosses (facteur 2 à N/P 2) par rapport au système basé sur la cystéine. Il semble donc que ce système échappe à un mode de condensation monomoléculaire même avec des conditions optimisées. Les meilleurs résultats, en termes de taille et de polydispersité, sont obtenus pour les complexes formulés au rapport N/P 1,5. Dans ces conditions, l'amphiphile F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH **36** permet d'obtenir une population faiblement polydisperse (Pdl~0,24) de NPs de 85 nm de diamètre présentant un potentiel zêta très négatif (-41 mV). Cependant, nous avons vu par retard sur gel que l'ADN reste accessible à ce rapport de charge. A N/P 2, le potentiel zêta reste très négatif (-38 mV), la taille des NPs est multipliée par deux tout en restant raisonnable (~160 nm) pour ce type d'applications *in vitro*, mais la polydispersité augmente (Pdl~0,38). A ce rapport N/P 2, les caractéristiques physico-chimiques des complexes ADN/**36** sont intéressantes, même si leur stabilité en milieu biologique ainsi que leur charge négative devraient contribuer à limiter leur capacité à transférer le gène sur cellules *in vitro*.

Concernant la stabilité en milieu plus agressif, il est à noter qu'un effet de dilution, ou une augmentation de la force ionique (150 mM NaCl), ne déstabilisent par les formulations à base de F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH **36**, que ce soit à N/P 1,5 ou à N/P 2 (résultats non présentés ici). A l'inverse, en travaillant à N/P 2 avec le conjugué stéaryl-Arg₈ en solution saline tamponnée HEPES (135 mM NaCl, 5,0 mM KCl, and 0,76 mM Na₂HPO₄), Futaki et al ont obtenu des populations polydisperses et instables de grosses particules (1437 ± 1273 nm après 3 min, et 5148 ± 3377 nm après 30 min).⁵⁹ Ainsi, nous pouvons supposer que les chaînes perfluoroalkylées contribuent efficacement au maintien de la stabilité colloïdale en limitant les interactions non spécifiques.

A N/P 3, le potentiel zêta des NPs devient proche de la neutralité (-3,6 mV) ce qui rend le système colloïdal instable. En l'absence de répulsions électrostatiques suffisantes, les NPs s'agglomèrent d'où une augmentation significative de leur taille (~1700 nm) et de l'indice de polydispersité (Pdl au maximum). Dans ces conditions, l'analyse DLS même, n'est plus fiable. Le constat est le même à N/P 5, avec un potentiel de surface légèrement positif (+14 mV) qui ne suffit pas à stabiliser le système.

A la vue de ces résultats, il apparaît que la formulation à N/P 2 présente le meilleur compromis pour la fonctionnalisation de surface.

V.2 FONCTIONNALISATION DE SURFACE DES NANOPARTICULES D'ADN

Nous avons ici évalué la capacité des conjugués pegylés octaarginine et perfluoroalkylés, utilisés en co-formulation avec l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36**, à fonctionnaliser la surface des complexes d'ADN. De la même façon que pour le système cystéine, nous avons réalisé cette étude avec le composé modèle acétylé F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b**.

V.2.1 EVALUATION DE L'INTEGRITE DES NANOPARTICULES APRES FONCTIONNALISATION

Une expérience de retard sur gel a été effectuée pour apprécier l'impact de la fonctionnalisation sur l'intégrité des complexes. Ces derniers ont ainsi été formulés à partir de l'agent F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** à N/P 2, utilisé en co-formulation avec 0 à 10 mol% de conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b**.

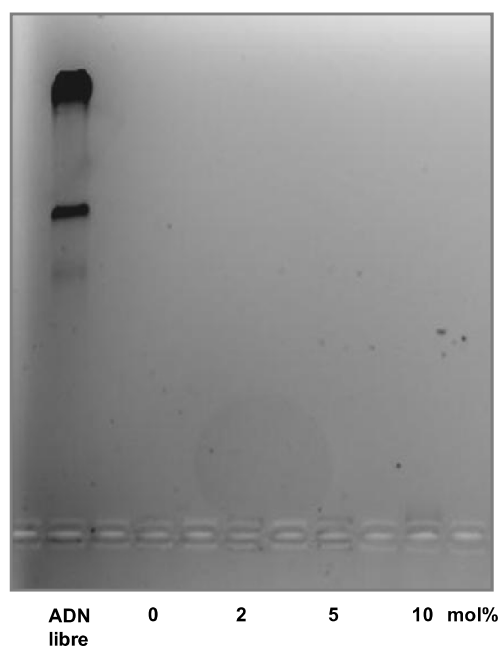


Figure 39 : Gel d'agarose des complexes ADN/ F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH à N/P 2 fonctionnalisés avec F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) à 0, 2, 5 ou 10 mol% (vs détergent)

Aux vues des résultats obtenus (**Figure 39**), le conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** peut être utilisé jusqu'à 5 mol% sans déstabiliser les complexes. En effet, il n'y a aucune illumination visible au sein des lignes **2** et **5 mol%** du gel. Néanmoins, à partir de 10 mol%, la présence d'une petite bande diffuse au dessus du puits témoigne d'une légère perturbation du système.

V.2.2 EXPERIENCE D'EXCLUSION DU BROMURE D'ETHIDIUM

Pour quantifier l'impact de l'addition du conjugué pegylé F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** dans les formulations, nous avons utilisé l'expérience de spectrofluorimétrie basée sur l'exclusion du bromure d'éthidium déjà décrite précédemment. Après marquage de l'ADN au BET, les complexes ont été formulés à partir de l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** à N/P 1,5 et 2, utilisés en co-formulation avec 0 à 14 mol% de conjugué **38b** par rapport au détergent. Nous avons choisi d'utiliser le rapport N/P

1,5 pour mieux visualiser l'ADN, qui reste plus accessible à ce rapport N/P, et mieux appréhender une éventuelle stabilisation ou déstabilisation du système.

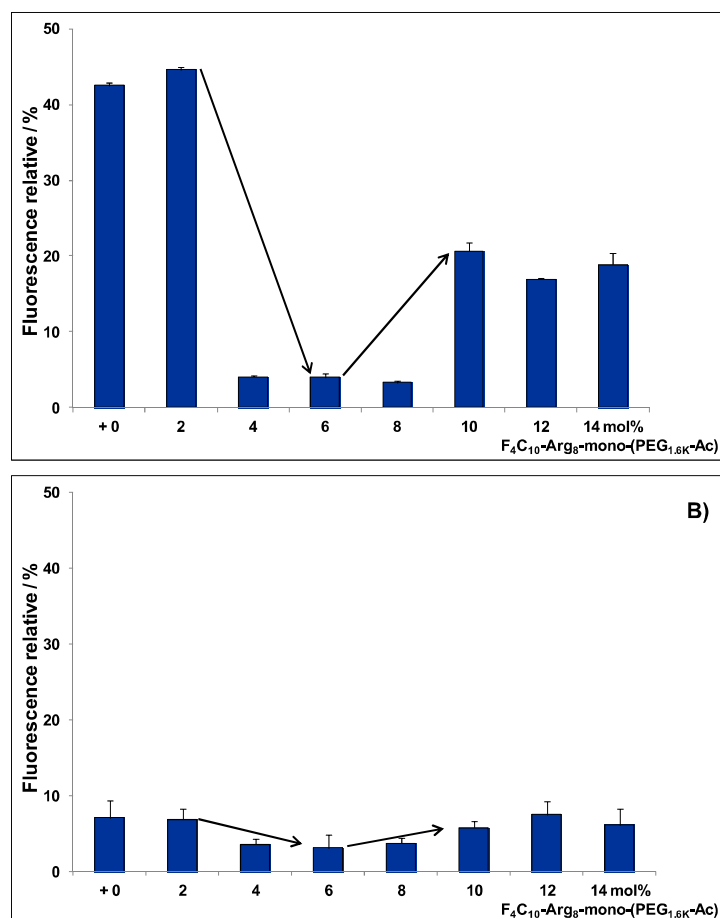


Figure 40 : Expérience d'exclusion du bromure d'éthidium à 25°C pour les complexes ADN/F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH à N/P 1,5 (A) et N/P 2 (B) avec 0 à 14 mol% de F₄C₁₀-Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) (vs détergent)

D'après les résultats obtenus (**Figure 40, A**), le conjugué F₄C₁₀-Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** a un impact significatif sur les complexes ADN/F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH **36** à N/P 1,5. En effet, l'addition de 4 mol% de **38b** abaisse d'environ 40% l'intensité relative de fluorescence du BET intercalé, puis l'effet s'inverse au-delà de 8 mol% ($F_{rel} \sim +15\%$). Ainsi, dans la fenêtre 4-8 mol% par rapport au détergent, le conjugué F₄C₁₀-Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** contribue activement au processus de condensation de l'ADN. Ceci constitue une preuve indéniable quant à l'efficacité de la fonctionnalisation. En effet, cette dernière est probablement favorisée par la présence des huit charges cationiques de l'arginine sur le conjugué pegylé, qui peuvent participer à la condensation de l'ADN. La même tendance est obtenue à N/P 2 mais avec un degré moins prononcé (**Figure 40, B**) à cause de ce même effet dont la contribution diminue avec l'augmentation du rapport N/P. L'impact de la fonctionnalisation sur le rapport total N/P est démontré (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Ajustement du rapport N/P pour un taux de fonctionnalisation de 5 mol% des NPs ADN/F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH par le conjugué F₄C₁₀-Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac)

N/P	N/P ajusté	Contribution (%)
1,5	1,6	6,25
2	2,1	4,75

V.2.3 MESURE DE TAILLE ET DE POTENTIEL ZETA

Le processus de fonctionnalisation a ensuite été étudié au moyen du suivi de la variation des diamètres hydrodynamiques et des potentiels zêta. Nous avons formulé les complexes ADN/ F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** à N/P 2, avec 0 à 5 mol% de conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b**. Les formulations ont ensuite été analysées par DLS et zétamétrie (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Taille et potentiel zêta des NPs à base du détergent F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH nues, ou fonctionnalisées avec le conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac)

Amphiphile	N/P	Quantité de PEG (mol%)	Taille (nm)	Potentiel zêta (mV)	Indice de polydispersité (Pdl)
F_4C_{10} -Arg ₈ -CH ₂ CCH	2	0	163 ± 4	-38,2 ± 1,0	0,38 ± 0,03
		1	157 ± 2	-42,3 ± 1,5	0,31 ± 0,01
		2	157 ± 3	-34,6 ± 2,2	0,33 ± 0,03
		5	163 ± 10	-40,6 ± 1,2	0,37 ± 0,03

En regardant les données, on constate que la mise en évidence de la fonctionnalisation est ici beaucoup plus subtile. En effet, ni la taille, ni le potentiel zêta des complexes ne paraissent impactés par ce processus.

Il faut néanmoins faire remarquer que les NPs nues ont ici une taille d'environ 160 nm contrairement à celles utilisées dans le cadre du système cystéine (~60 nm). La contribution à l'augmentation du diamètre hydrodynamique due aux conjugués pegylés, qui s'élevait à ~30 % dans le cas du système cystéine, ne s'élèverait ici plus qu'à 10 % (plus difficile à mettre en évidence). D'autre part, avec un octacation et à un rapport N/P 2, les concentrations de l'agent de compaction et du conjugué pegylé pour une fonctionnalisation à 5 mol% sont respectivement de 3,75 µM et de 0,19 µM. Pour le monocation cystéine utilisé à N/P 5 avec 5 mol% de conjugués, ces mêmes concentrations sont de 75,0 µM et 3,75 µM respectivement (soit 2 log de différence). Ces écarts expliquent donc en partie qu'il soit impossible de noter ces variations en DLS. De la même façon, ces chiffres expliquent aussi le maintien des potentiels zêta. Par voie de conséquence, nous pouvons au contraire conclure, qu'additionnés aux expériences précédentes, ces résultats démontrent bien une fonctionnalisation.

V.2.4 MORPHOLOGIE DES COMPLEXES

La morphologie et la taille des complexes a également été analysée par MET. Nous avons formulé des NPs à base de F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** nues, ou fonctionnalisées avec 5 mol% du conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b**. Les photos obtenues sont représentées dans la **Figure 41** ci-après.

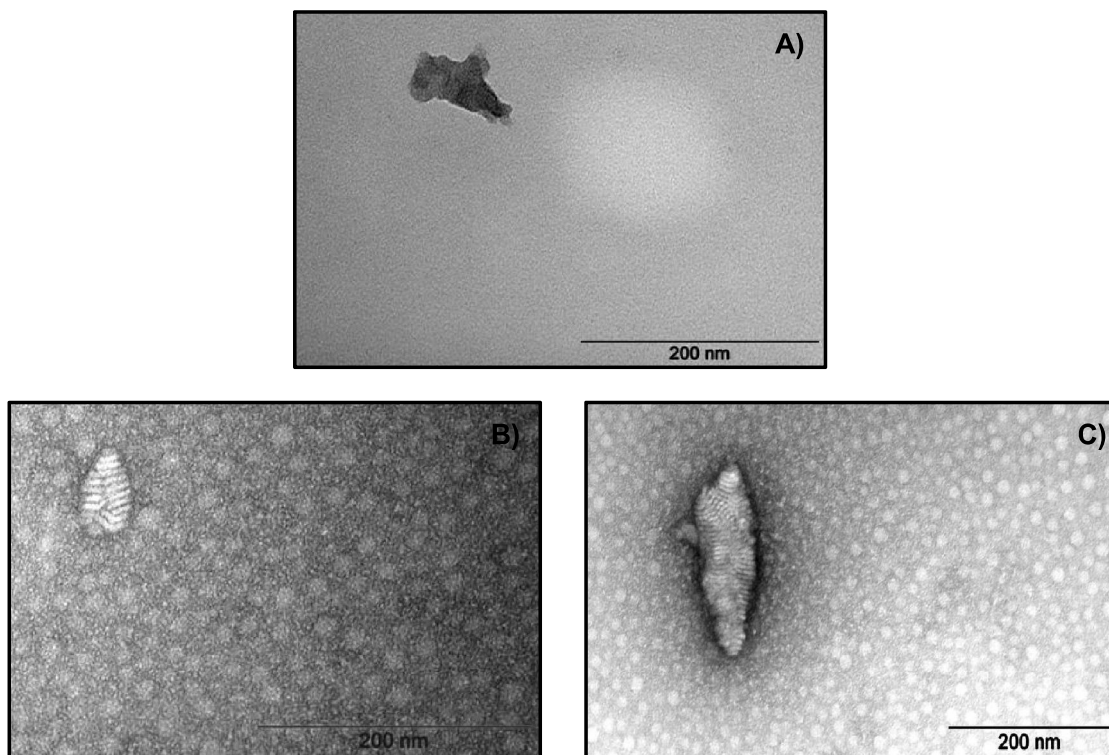


Figure 41 : Microscopie Electronique en Transmission des NPs ADN/ F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH à N/P 1,5 **A)** nues, **B)** et **C)** avec 5 mol% de F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac)

Les NPs nues (**A**) ont une morphologie globulaire, avec un diamètre de 91 ± 18 nm en accord avec les résultats prédits par DLS. Les NPs fonctionnalisées avec le conjugué pégylé apparaissent plus polydisperses puisque leur taille varie entre 65 nm (**B**) et 130 nm (**C**). On voit bien dans l'image (**C**) que l'on a probablement plusieurs copies du plasmide. Finalement, les images (**B**) et (**C**) montrent des formes enroulées, les composés forment donc des mésophases tubulaires avec l'ADN.

V.3 CONCLUSION SUR L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES D'ADN A BASE DE DERIVES OCTAARGININE

Cette étude physico-chimique nous a permis d'appréhender le comportement des dérivés octaarginine perfluoroalkylés avec l'ADN. Ainsi, le composé F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** conduit, à N/P 2, à la formation de nanoparticules d'ADN anioniques montrant une certaine stabilité en milieu ionique et présentant des tailles de l'ordre de 160 nm ($PdI \sim 0,4$). La fonctionnalisation avec le conjugué pégylé modèle F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** est mise en avant, notamment par les expériences d'exclusion du BET, qui montrent que ce dernier participe activement au processus de condensation de l'ADN entre 4 et 8 mol%. Les expériences de DLS et de potentiel zêta confirment la bonne stabilité colloïdale du système dans les conditions étudiées.

VI. ETUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES NANOPARTICULES D'ADN A BASE DE DERIVES OCTAARGININE

VI.1 TRANSFECTION *IN VITRO* DES COMPLEXES

Nous avons évalué l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des NPs formulées avec l'amphiphile F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** à N/P 1,5, 2 et 5, avec 0, 2 ou 5 mol% de F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a** ou F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **41** (vs détergent). Les expériences ont été réalisées sur lignées cellulaires HeLa, avec des polyplexes de JetPEI à N/P 10 et l'ADN nu comme contrôles positif et négatif, respectivement. Les résultats sont représentés dans la **Figure 42** ci-dessous.

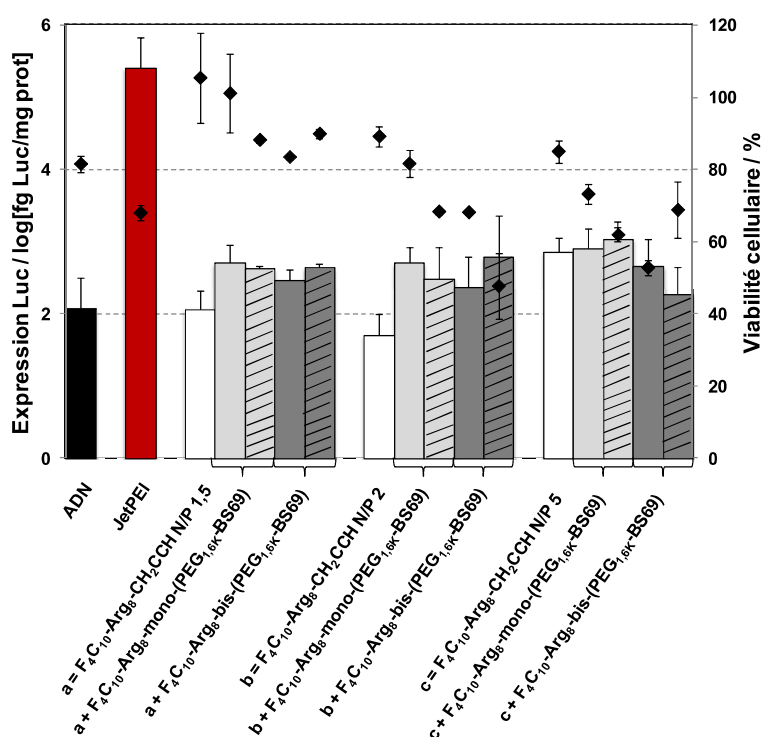


Figure 42 : Efficacité de transfection (barres) et viabilité cellulaire (losanges) sur cellules HeLa des NPs d'ADN formulées avec F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH à N/P 1,5, 2 et 5, nues (\square) ou avec 2 mol% (uni) ou 5 mol% (hachures) de F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) (\square) ou F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) (\blacksquare) ;
contrôles : JetPEI à N/P 10 et ADN

Globalement, les résultats sont très décevants quels que soient les rapports de charge. A N/P 2, les NPs nues à base de l'octaarginine perfluoroalkylée F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** ne transfectent pas mieux que l'ADN non vectorisé. Pourtant, Futaki et al ont obtenu des efficacités de transfection comparables à celle de la Lipofectamine commerciale avec le conjugué stéaryl-Arg₈ utilisé à N/P 2. Les cellules sont alors transfectées avec des particules ADN/stéaryl-Arg₈ de taille supérieure à 5000 nm. Ainsi, la sédimentation probable des particules à la surface des cellules adhérentes favorise l'internalisation des complexes. Dans notre cas, outre leur charge, la taille des NPs de l'ordre de 160 nm pourrait aussi limiter leur rencontre avec les cellules, et expliquer leur inefficacité. Même si la présence de ligands DLC8-AS semble améliorer l'efficacité de transfection des formulations, les écarts restent assez faibles et aucun effet lié à la dimérisation DLC8-AS n'est ici observé.

A N/P 5, les NPs ADN/**36** transfectent légèrement mieux que l'ADN nu (~10 fois), probablement grâce à leur charge de surface positive (+14 mV), sans pour autant atteindre l'efficacité escomptée. Les ligands DLC8-AS n'ont pas d'effet dans ces conditions. Finalement, la mortalité cellulaire est très faible pour les NPs non fonctionnalisées et augmente globalement avec le rapport de charge et la présence de séquences BS69.

Pour tenter de comprendre ces résultats, nous avons réalisé une expérience de transfection avec les NPs ADN/F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH **36** à N/P 5 en présence d'un agent endosomolytique, la chloroquine (résultats non présentés ici). L'addition de chloroquine a souvent été rapportée pour améliorer l'efficacité de transfection des peptides cationiques tels que les polylysines et les polyarginines.⁵⁹ Toutefois, de la même façon que pour les complexes ADN/stéaryl-Arg₈, ce traitement n'a pas permis d'augmenter le niveau de transfection des NPs ADN/**36**. Ainsi, l'échappement endosomal, probablement facilité par l'effet détergent de l'agent de compaction **36**, ne semble pas être une étape limitante dans le cas de ces formulations. Par ailleurs, les octaarginines étant connues pour leurs propriétés CPP, il est peu probable que la translocation de la membrane plasmique constitue une barrière dans notre cas.

Des résultats, en conditions plus classiques de transfection à N/P 10 et même 20 ne sont pas plus intéressants (non présentés ici).

VI.2 CONCLUSION SUR L'ETUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES NANOPARTICULES D'ADN A BASE DE DERIVES OCTAARGININE

D'après les données de la littérature, les amphiphiles octaarginine tels que le composé stéaryl-Arg₈ sont des agents de transfection efficaces.⁵⁹ Néanmoins, nous venons de montrer que son analogue perfluoroalkylé F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH **36** ne conduisait qu'à de faibles taux d'expression de la luciférase sur cellules HeLa, et que ce système n'était pas approprié pour mettre en avant l'intérêt de séquences DLC8-AS dimériques sur le trafic intracellulaire de complexes d'ADN. Ces résultats ne sont pas étonnants dans le sens où seuls les faibles rapports N/P présentent des caractéristiques exploitables en termes de taille et de dispersion. En conséquence, au rapport N/P 2 étudié, il faut noter que la concentration totale en conjugué pegylé à 5 mol% de fonctionnalisation ne représente que 0,19 µM. Nous sommes donc 20 fois moins concentrés qu'avec le système cystéine. Cependant, des expériences réalisées à des rapports N/P où les concentrations sont équivalentes n'apportent rien. Nous pouvons également nous interroger quant à la stabilité et/ou l'internalisation de ces complexes en milieu biologique ? Ces questions demeurent pour l'instant sans réponse.

VII. FONCTIONNALISATION DE POLYPLEXES DE PEI PAR DES SEQUENCES DIMERIQUES

DLC8-AS

Les stratégies recensées dans la littérature visant à cibler les chaînes LC8 de la dynéine n'ont révélé qu'une amélioration modeste des niveaux de transfection par des vecteurs non viraux (cf. **chapitre I, paragraphe III**). Et globalement, on peut dire qu'il n'est pas facile de dépasser les niveaux de transfection du système référence ADN/JetPEI à N/P 10. Nous avons donc souhaité décorer des polyplexes de PEI branché (25 kDa) et de JetPEITM avec des conjugués bis-DLC8-AS pour tenter d'améliorer le niveau de transfection de ce système standard.

En se basant sur les résultats obtenus à partir des trois systèmes que nous avons développés, le conjugué issu de la stratégie 1,2-dithiolane a été définitivement écarté à cause de la trop grande stabilité des complexes formés. En s'appuyant sur les constantes d'association que nous avons déterminées et sur le fait qu'un octacation devrait probablement mieux déplacer l'équilibre de répartition du système PEI-ADN, nous avons opté pour les conjugués pegylés octaarginine et perfluoroalkylés.

Concrètement, nous avons adapté la stratégie précédente à un système de type polyplexe, en remplaçant l'amphiphile F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH **36** par le PEIb (25 kDa) ou le JetPEI. La formulation des NPs d'ADN se fait alors en deux étapes suivant le processus décrit (**Figure 43**) :

- **Etape 1** : L'ADN est condensé par le polymère polycationique, PEIb ou JetPEI.
- **Etape 2** : La surface est décorée en ajoutant le conjugué pegylé octaarginine et perfluoroalkylé F₄C₁₀-Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **41**, ou le contrôle F₄C₁₀-Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a**.

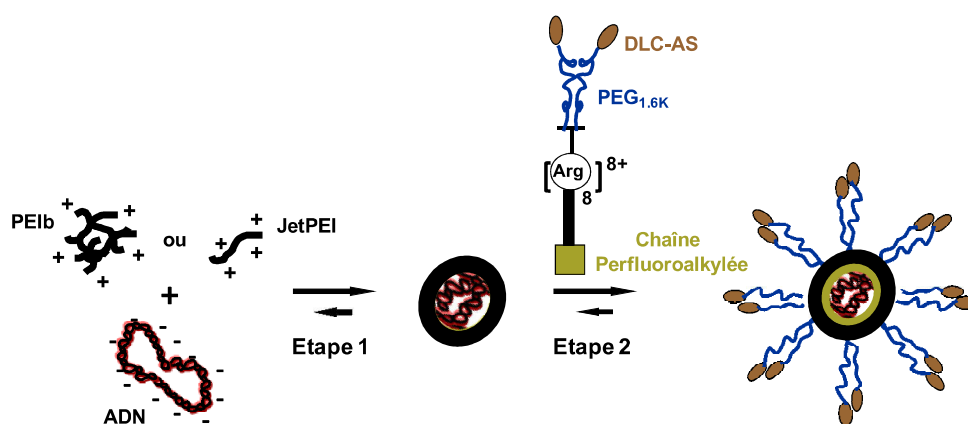


Figure 43 : Fonctionnalisation de polyplexes de PEI par les conjugués DLC8-AS

VII.1 FORMULATION DES POLYPLEXES DE PEI DECORES PAR LES CONJUGUES PEGYLES

OCTAARGININE ET PERFLUOROALKYLES

Concernant la préparation des complexes d'ADN à base de PEI (PEIb 25 kDa et JetPEI), l'ADN plasmidique est dilué dans une solution de NaCl à 150 mM à la concentration souhaitée, et la quantité désirée de PEIb ou de JetPEI (rapport N/P 10) est additionnée à partir d'une solution stock dans l'HEPES ou dans l'eau, respectivement. La suspension est laissée sous agitation à température ambiante pendant une heure. Les complexes fonctionnalisés, le sont par ajout des conjugués pegylés perfluoroalkylés (solutions stock dans l'HEPES) à la moitié du temps d'agitation (i.e. 30 min). Les protocoles sont décrits dans la partie expérimentale (**partie III, paragraphe IV**).

VII.2 CARACTERISATION PHYSIQUE DES POLYPLEXES DE PEI DECORES

Nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques physiques des complexes d'ADN formulés à partir des polymères polycationiques PEIb et JetPEI, avec ou sans fonctionnalisation de surface par le conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a**. Nous avons effectivement mis de côté le conjugué modèle F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-Ac) **38b** pour plus d'homogénéité entre les résultats physico-chimiques et *in vitro*. Il s'agit de déterminer la taille des complexes d'ADN et leur potentiel zêta afin d'évaluer l'efficacité du processus de fonctionnalisation. Nous avons ainsi formulé les polyplexes de PEI (PEIb 25 kDa et JetPEI) de façon conventionnelle à N/P 10 avec 0 à 20 mol% de conjugué pegylé **38a**. Les formulations ont ensuite été analysées par zétamétrie et DLS (**Figure 44** et **45**, resp.).

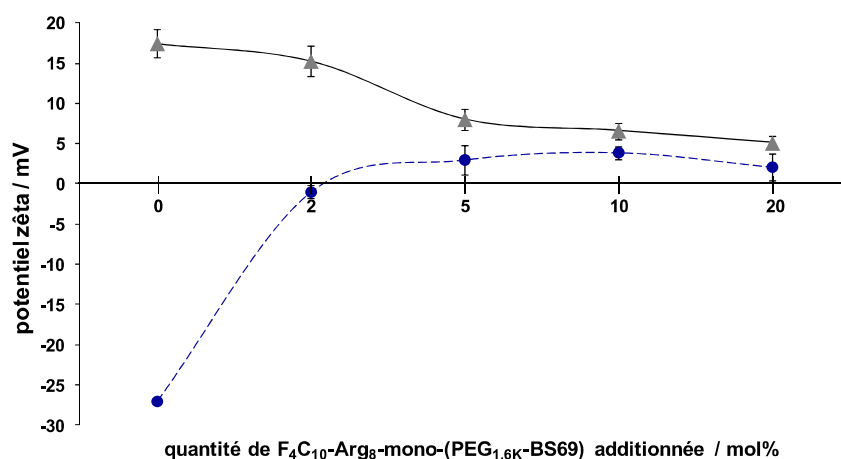


Figure 44 : Potentiel zêta des complexes ADN/PEIb (●) et ADN/JetPEI (▲) à N/P 10 avec F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) à 0, 2, 5, 10 ou 20 mol% (vs agent compactant)

En zétamétrie, les résultats sont relativement différents suivant le polymère utilisé, PEI branché ou linéaire (JetPEI). Pour les polyplexes de PEIb, l'ajout progressif du conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a** dans les formulations conduit à une augmentation du potentiel zêta qui passe de négatif à légèrement positif (~-27 mV à +3 mV). Un plateau est atteint avec un taux de fonctionnalisation de 5-10 mol%. A l'inverse, l'addition du conjugué **38a** sur des polyplexes de JetPEI entraîne une diminution

du potentiel zêta qui passe de très positif à légèrement positif ($\sim +17$ mV à $+5$ mV). Un plateau est également atteint, avec des quantités comparables de conjugué pegylé (5-10 mol%). Pour expliquer ces résultats, il faut s'intéresser au taux de protonation du PEIb et du JetPEI dans les conditions utilisées (15 μ M en ADN, N/P 10, 150 mM NaCl, pH 7). En effet, le taux d'amines protonées est estimé à seulement 10-20% pour le PEIb,⁸⁶ or ces dernières sont responsables des interactions ioniques entre le polymère et l'ADN. Ainsi, les faibles interactions ADN/PEIb expliquent l'obtention de polyplexes chargés négativement. Dans ce cas, l'augmentation du potentiel zêta suite à l'ajout du conjugué pegylé provient probablement des interactions électrostatiques entre l'ADN et les arginines, qui sont totalement chargées à ce pH. A l'inverse, jusqu'à 90% des amines du JetPEI sont protonées à pH physiologique,⁸⁷ ce qui explique l'obtention de polyplexes chargés positivement. Dans ce cas, la diminution du potentiel zêta suite à l'ajout de l'agent de fonctionnalisation résulte de la diminution de la mobilité électrophorétique (grandeur qui entre en considération dans le calcul du potentiel zêta, cf. **Annexe 1**) due à la fonctionnalisation par le conjugué pegylé qui masque la charge de surface cationique. Néanmoins, dans chaque cas, le plateau témoigne d'une fonctionnalisation efficace des polyplexes de PEI avec le conjugué perfluoroalkylé octaarginine F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a** utilisé à des taux de 5-10 mol% de conjugués pegylé. On peut noter qu'ici, 5 mol% de conjugué correspond à une concentration de 7,5 μ M, ce qui représente une nette augmentation en agent de fonctionnalisation (~ 40 fois) par rapport au cas précédent (décoration de NPs à base de F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** uniquement) et dans la même gamme que le système cystéine.

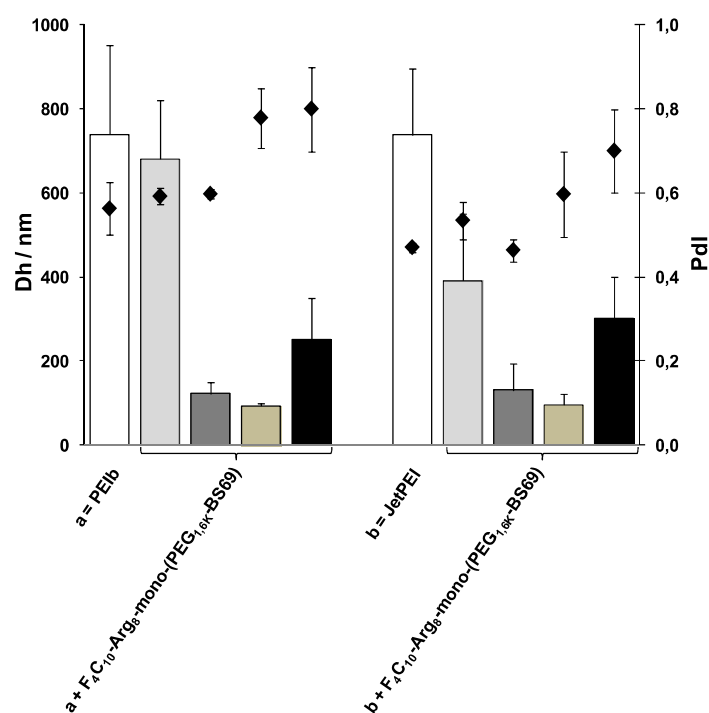


Figure 45 : Diamètre hydrodynamique (barres) et indice de polydispersité (losanges) des complexes ADN/PEIb et ADN/JetPEI à N/P 10 avec F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) à 0 (□), 2 (□), 5 (■), 10 (■) ou 20 (■) mol% (vs détergent)

Les expériences de DLS confirment l'efficacité du processus de fonctionnalisation. En effet, le diamètre hydrodynamique des polyplexes de PEIb et de JetPEI décroît progressivement avec l'ajout de l'agent de fonctionnalisation, jusqu'à environ 125 et 95 nm à 5 et 10 mol%, respectivement. Ces taux de fonctionnalisation sont aussi accompagnés des plus faibles écarts types et Pdl (excepté à 10 mol% où le Pdl augmente). Cela signifie que le dérivé octaarginine interagit fortement avec les polyplexes et participe activement au processus de condensation de l'ADN. Finalement, de plus hauts taux de conjugué pegylé **38a** déstabilisent le système en altérant la taille, l'écart type et le Pdl (cf. 20 mol%).

VII.3 ETUDE DU COMPORTEMENT *IN VITRO* DES POLYPLEXES DE PEI DECORES

En se basant sur les résultats obtenus à l'issu des expériences de physico-chimie, nous avons utilisé le système de type PEI fonctionnalisé à hauteur de 5 mol% pour la suite de l'étude, les formulations correspondantes présentant les plus petites tailles, ainsi que les plus faibles écarts types et indices de polydispersité. Nous avons ainsi évalué les polyplexes fonctionnalisés avec 5 mol% de F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) **38a** ou de F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) **41** sur des cellules HeLa en utilisant les polyplexes nus de PEIb (25 kDa) et de JetPEI à N/P 10 comme contrôles positifs, et l'ADN nu comme contrôle négatif. Par ailleurs, les expériences ont été conduites avec ou sans nocodazole, pour évaluer l'effet de la dépolymérisation des microtubules. Les résultats sont représentés dans la **Figure 46** ci-dessous.

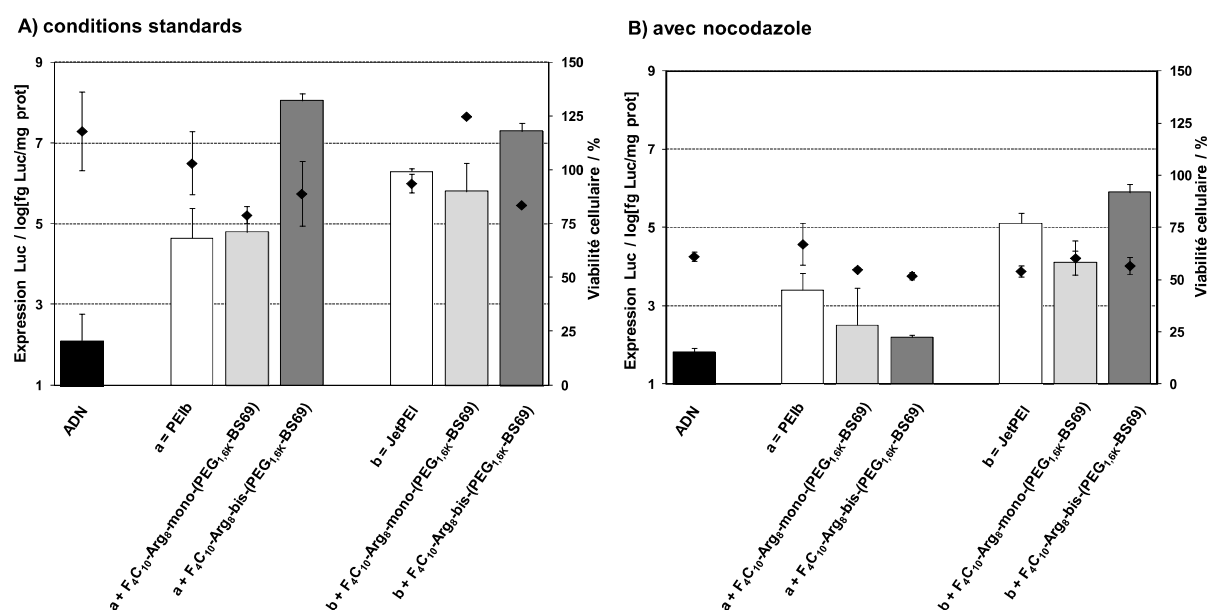


Figure 46 : Efficacité de transfection (barres) et viabilité cellulaire (losanges) sur cellules HeLa des NPs d'ADN formulées avec PEIb et JetPEI à N/P 10 nues (□) ou avec 5 mol% de F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1,6K}-BS69) (□) ou F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1,6K}-BS69) (■) en l'absence (graphe A) ou en présence (graphe B) de nocodazole ; **contrôle négatif** : ADN

De façon remarquable, lorsque le réseau de microtubules est intact (sans nocodazole), l'efficacité de transfection des polyplexes fonctionnalisés avec le conjugué bis-DLC8-AS est augmentée de 3,4 et 1 ordre de grandeur par rapport aux polyplexes de PEIb et JetPEI nus, respectivement. La formulation

la plus probante est celle à base de PEIb, l'efficacité étant 50 fois supérieure aux polyplexes du JetPEI standard. Par ailleurs, on peut noter que la fonctionnalisation des complexes ADN/PEIb et ADN/JetPEI avec le conjugué mono-DLC8-AS ne permet pas d'améliorer l'efficacité de transfection, mieux, elle ne fonctionne absolument pas. En effet, dans les deux cas, les niveaux de transfection des polyplexes fonctionnalisés sont équivalents à ceux des polyplexes nus. Ces résultats, alliés à ceux obtenus avec le système cystéine, où les concentrations en conjugués ajoutées étaient deux fois moindres, semblent conforter l'hypothèse d'un effet multivalent. En effet, il semble peu probable qu'ici, avec des concentrations deux fois plus importantes en conjugués par rapport au système cystéine, le dérivé mono-DLC8-AS n'ait aucun effet sur le transfert de gènes alors que son dimère produise de telles augmentations. Les deux systèmes présentent tout de même des différences qui pourraient expliquer ces variations autrement que par l'effet bivalent énoncé. En termes de tailles tout d'abord, avec un diamètre de 125 nm, dans le meilleur des cas, pour les polyplexes de PEIb, la surface des NPs est multipliée par cinq par rapport aux NPs du système cystéine. En termes d'homogénéité de la fonctionnalisation d'autre part, il n'est pas aberrant de penser que le système cystéine puisse produire une fonctionnalisation plus homogène que dans le cas des polyplexes. En effet, dans le système cystéine, les agents de compaction et les conjugués pegylés, utilisés en co-formulation, sont de même nature chimique ce qui favorise leur organisation supramoléculaire. Au contraire, dans le cas des PEI, les conjugués de type amphiphiles octaarginine sont de nature différente et sont utilisés en post-complexation. Dans ce dernier cas, la formation d'îlots liée à l'auto-organisation des chaînes perfluoroalkylées pourrait contribuer à une certaine hétérogénéité de la fonctionnalisation, qui déplacerait l'équilibre de répartition et diminuerait la fonctionnalisation effective. Cependant dans ce dernier cas, nous pourrions aussi bénéficier d'un effet multivalent lié à l'auto-organisation des amphiphiles octaarginine portant les ligands mono-DLC8-AS. Nous pouvons donc raisonnablement penser que ces différences nettes d'efficacité entre les mono- et les bis-DLC8-AS sont liées à l'effet bivalent des ligands. L'impact significatif sur l'efficacité de transfection peut alors être attribué à une meilleure affinité pour la dynéine.

Les expériences menées en présence de nocodazole mettent effectivement en évidence un mécanisme dépendant des microtubules et donc impliquant la dynéine. En effet, non seulement tous les niveaux de transfection sont abaissés, mais l'effet sur les polyplexes de PEIb conjugués au bis-DLC8-AS est très significatif (6 log). Ceux-ci se retrouvent totalement inhibés par rapport au polyplexes nus. Toutefois, et de façon surprenante, le niveau de transfection des formulations avec le conjugué bis-DLC8-AS sur les polyplexes de JetPEI reste élevé.

Finalement, le profil de viabilité cellulaire montre que la fonctionnalisation est bien tolérée par les cellules. En effet, aucun des polyplexes fonctionnalisés ne tombe sous 75% de viabilité.

VIII. CONCLUSION SUR LES SYSTEMES A BASE DE DERIVES OCTAARGININE

Dans le cadre de ce projet, nous avons synthétisé l'amphiphile octaarginine et perfluoroalkylé F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** qui s'est révélé efficace comme agent de compaction en permettant l'obtention de NPs d'ADN avec des tailles d'environ 160 nm. Nous avons aussi transposé sans encombre la stratégie de synthèse des conjugués pegylés cystéine à l'obtention des agents de fonctionnalisation octaarginine et perfluoroalkylés mono- et bis-DLC8-AS. Pourtant, ce système purement peptidique n'a pas permis d'obtenir des niveaux de transfection suffisants sur cellules HeLa pour montrer l'intérêt d'une fonctionnalisation de surface par des séquences bis-DLC8-AS. Nous nous sommes donc orientés vers une stratégie mixte, visant à décorer des polyplexes de PEI (PEIb et JetPEI) par ces mêmes conjugués pegylés octaarginine mono- et bis-DLC8-AS. Nous avons ainsi montré qu'un taux de fonctionnalisation de 5 mol% représentait le taux maximum permettant de préserver la stabilité colloïdale des formulations (haute dispersion, petite taille). Finalement, et de façon remarquable, l'utilisation du conjugué bis-DLC8-AS basé sur le peptide BS69, formulé à 5 mol% avec des polyplexes de PEIb (25 kDa), a permis d'atteindre une efficacité de transfection 50 fois supérieure à celle du JetPEI de référence, et ce suivant un mécanisme dépendant des microtubules et de la dynéine.

Pour conclure, il semble bien qu'outre un seuil à dépasser, purement basé sur la concentration en ligands, l'effet bivalent des conjugués bis-DLC8-AS soit impliqué dans l'amélioration de l'efficacité du transfert de gènes par le système dynéine/MTs. Cette stratégie présente donc un intérêt indéniable, même si des inconvénients majeurs demeurent comme l'impossibilité de prédire une amélioration *a priori*. Nous avons en effet montré que les mêmes ligands appliqués à deux systèmes produisaient des résultats diamétralement opposés. La maîtrise de tous les paramètres visant à l'élaboration de virus synthétiques toujours plus efficaces et donc encore loin d'être totalement sous contrôle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alberts, B.; Johnson, A.; Walter, P.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. eds. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, 5th edition, **2007**.
2. Pollard, T. D.; Cooper, J. A., Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **2009**, 326, (5957), 1208-1212.
3. Goldman, R. D.; Cleland, M. M.; Murthy, P.; Mahammad, S.; Kuczmarski, E. R., Inroads into the structure and function of intermediate filament networks. *J Struct Biol* **2012**, 177, (1), 14-23.
4. Etienne-Manneville, S., From signaling pathways to microtubule dynamics: The key players. *Curr Opin Cell Biol* **2010**, 22, (1), 104-111.
5. Job, D.; Valiron, O.; Oakley, B., Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* **2003**, 15, (1), 111-117.
6. Gardner, M. K.; Zanic, M.; Howard, J., Microtubule catastrophe and rescue. *Curr Opin Cell Biol* **2013**, 25, (1), 14-22.
7. Ross, J. L.; Ali, M. Y.; Warshaw, D. M., Cargo transport: Molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **2008**, 20, (1), 41-47.
8. Hartman, M. A.; Spudich, J. A., The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci* **2012**, 125, (7), 1627-1632.
9. Marx, A.; Hoenger, A.; Mandelkow, E., Structures of kinesin motor proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **2009**, 66, (11), 958-966.
10. Roberts, A. J.; Kon, T.; Knight, P. J.; Sutoh, K.; Burgess, S. A., Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, 14, (11), 713-726.
11. Pfister, K. K.; Shah, P. R.; Hummerich, H.; Russ, A.; Cotton, J.; Annular, A. A.; King, S. M.; Fisher, E. M. C., Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet* **2006**, 2, (1), e1.
12. Schliwa, M.; Woehlke, G., Molecular motors. *Nature* **2003**, 422, (6933), 759-765.
13. Rapali, P.; Szenes, Á.; Radnai, L.; Bakos, A.; Pál, G.; Nyitray, L., DYNLL/LC8: A light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS J* **2011**, 278, (17), 2980-2996.
14. García-Mayoral, M. F.; Martínez-Moreno, M.; Albar, J. P.; Rodríguez-Crespo, I.; Bruix, M., Structural basis for the interaction between dynein light chain 1 and the glutamate channel homolog GRINL1A. *FEBS J* **2010**, 277, (10), 2340-2350.
15. Wu, H.; Maciejewski, M. W.; Takebe, S.; King, S. M., Solution structure of the Tctex1 dimer reveals a mechanism for dynein-cargo interactions. *Structure* **2005**, 13, (2), 213-223.
16. King, S. M.; Barbarese, E.; Dillman, J. F.; Patel-King, R. S.; Carson, J. H.; Pfister, K. K., Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J Biol Chem* **1996**, 271, (32), 19358-19366.
17. Benison, G.; Karplus, P. A.; Barbar, E., Structure and dynamics of LC8 complexes with KXTQT-motif peptides: Swallow and dynein intermediate chain compete for a common site. *J Mol Biol* **2007**, 371, (2), 457-468.
18. Stelter, P.; Kunze, R.; Flemming, D.; Hopfner, D.; Diepholz, M.; Philippsen, P.; Bottcher, B.; Hurt, E., Molecular basis for the functional interaction of dynein light chain with the nuclear-pore complex. *Nat Cell Biol* **2007**, 9, (7), 788-796.
19. Fan, J.-S.; Zhang, Q.; Tochio, H.; Li, M.; Zhang, M., Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain1. *J Mol Biol* **2001**, 306, (1), 97-108.
20. Toledo, M. A. S.; Janissen, R.; Favaro, M. T. P.; Cotta, M. A.; Monteiro, G. A.; Prazeres, D. M. F.; Souza, A. P.; Azzoni, A. R., Development of a recombinant fusion protein based on the dynein light chain LC8 for non-viral gene delivery. *J Control Release* **2012**, 159, (2), 222-231.
21. Hall, J.; Karplus, P. A.; Barbar, E., Multivalency in the assembly of intrinsically disordered dynein intermediate chain. *J Biol Chem* **2009**, 284, (48), 33115-33121.

22. Merino-Gracia, J.; García-Mayoral, M. F.; Rodríguez-Crespo, I., The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. *FEBS J* **2011**, 278, (17), 2997-3011.
23. Radtke, K.; Dohner, K.; Sodeik, B., Viral interactions with the cytoskeleton: A hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* **2006**, 8, (3), 387-400.
24. Martínez-Moreno, M.; Navarro-Lérida, I.; Roncal, F.; Albar, J. P.; Alonso, C.; Gavilanes, F.; Rodríguez-Crespo, I., Recognition of novel viral sequences that associate with the dynein light chain LC8 identified through a pepscan technique. *FEBS Lett* **2003**, 544, (1-3), 262-267.
25. Parassol, N.; Bienvenu, C.; Boglio, C.; Fiorucci, S.; Cerezo, D.; Yu, X.-M.; Godeau, G.; Greiner, J.; Vierling, P.; Noselli, S.; Di Giorgio, C.; Van De Bor, V., In vivo characterization of dynein-driven nanovectors using drosophila oocytes. *PLoS ONE* **2013**, 8, (12), e82908.
26. Doyle, S. R.; Chan, C. K., Differential intracellular distribution of DNA complexed with polyethylenimine (PEI) and PEI-polyarginine PTD influences exogenous gene expression within live COS-7 cells. *Genet Vaccines Ther* **2007**, 5, 11.
27. Alonso, M. C.; Hernaez, D. L. P. B.; Martinez, E. J. A., New antiviral peptides from African swine fever virus which prevent the binding of the virus to DLC8. patent WO2009053340 A1 **2009**.
28. Moseley, G. W.; Roth, D. M.; DeJesus, M. A.; Leyton, D. L.; Filmer, R. P.; Pouton, C. W.; Jans, D. A., Dynein light chain association sequences can facilitate nuclear protein import. *Mol Biol Cell* **2007**, 18, (8), 3204-3213.
29. Moseley, G. W.; Leyton, D. L.; Glover, D. J.; Filmer, R. P.; Jans, D. A., Enhancement of protein transduction-mediated nuclear delivery by interaction with dynein/microtubules. *J Biotechnol* **2010**, 145, (3), 222-225.
30. Tanaka, K.; Kanazawa, T.; Sugawara, K.; Horiuchi, S.; Takashima, Y.; Okada, H., A cytoplasm-sensitive peptide vector cross-linked with dynein light chain association sequence (DLCAS) enhances gene expression. *Int J Pharm* **2011**, 419, (1-2), 231-234.
31. Akita, H.; Enoto, K.; Tanaka, H.; Harashima, H., Particle tracking analysis for the intracellular trafficking of nanoparticles modified with African swine fever virus protein p54-derived peptide. *Mol Ther* **2013**, 21, (2), 309-317.
32. Fabio, K.; Di Giorgio, C.; Vierling, P., New perfluorinated polycationic dimerizable detergents for the formulation of monomolecular DNA nanoparticles and their in vitro transfection efficiency. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1724, (1-2), 203-214.
33. Le Gourriérec, L.; Di Giorgio, C.; Greiner, J.; Vierling, P., Formulation of PEG-folic acid coated nanometric DNA particles from perfluoroalkylated cationic dimerizable detergents and in vitro folate-targeted intracellular delivery. *New J Chem* **2008**, 32, (11), 2027-2042.
34. Pigeon, L.; Gonçalves, C.; Gosset, D.; Pichon, C.; Midoux, P., An E3-14.7K peptide that promotes microtubules-mediated transport of plasmid DNA increases polyplexes transfection efficiency. *Small* **2013**, 9, (22), 3845-3851.
35. Favaro, M. T. P.; de Toledo, M. A. S.; Alves, R. F.; Santos, C. A.; Beloti, L. L.; Janissen, R.; de la Torre, L. G.; Souza, A. P.; Azzoni, A. R., Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. *J Biotechnol* **2014**, 173, 10-18.
36. Radnai, L.; Rapali, P.; Hódi, Z.; Süveges, D.; Molnár, T.; Kiss, B.; Bécsi, B.; Erdödi, F.; Buday, L.; Kardos, J.; Kovács, M.; Nyitray, L., Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms. *J Biol Chem* **2010**, 285, (49), 38649-38657.
37. Rapali, P.; Radnai, L.; Süveges, D.; Harmat, V.; Tölgyesi, F.; Wahlgren, W. Y.; Katona, G.; Nyitray, L.; Pál, G., Directed evolution reveals the binding motif preference of the LC8/DYNLL hub protein and predicts large numbers of novel binders in the human proteome. *PLoS ONE* **2011**, 6, (4), e18818.
38. Manning, G. S., The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q Rev Biophys* **1978**, 11, (2), 179-246.
39. Bloomfield, V. A., DNA condensation. *Curr Opin Struct Biol* **1996**, 6, (3), 334-341.
40. Wilson, R. W.; Bloomfield, V. A., Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry* **1979**, 18, (11), 2192-2196.

41. Husale, S.; Grange, W.; Karle, M.; Bürgi, S.; Hegner, M., Interaction of cationic surfactants with DNA: a single-molecule study. *Nucleic Acids Res* **2008**, 36, (5), 1443-1449.
42. Blessing, T.; Remy, J. S.; Behr, J. P., Template oligomerization of DNA-bovond cations produces calibrated nanometric particules. *JACS* **1998**, 120, 8519-8520.
43. Sadownik, A.; Stefely, J.; Regen, S. L., Polymerized liposomes formed under extremely mild conditions. *JACS* **1986**, 108, (24), 7789-7791.
44. Stefely, J.; Markowitz, M. A.; Regen, S. L., Permeability characteristics of lipid bilayers from lipoic acid-derived phosphatidylcholines. Comparison of monomeric, crosslinked and noncrosslinked polymerized membranes. *JACS* **1988**, 110, (22), 7463-7469.
45. Thomas, R. C.; Reed, L. J., Disulfide Polymers of DL- α -Lipoic Acid. *JACS* **1956**, 78, (23), 6148-6149.
46. Endo, K.; Yamanaka, T., Copolymerization of lipoic acid with 1,2-dithiane and characterization of the copolymer as an interlocked cyclic polymer. *Macromolecules* **2006**, 39, (12), 4038-4043.
47. Hao, Y.; Zhang, M.; He, J.; Ni, P., Magnetic DNA vector constructed from PDMAEMA polycation and PEGylated brush-type polyanion with cross-linkable shell. *Langmuir* **2012**, 28, (15), 6448-6460.
48. Li, H.; Sun, X.; Zhao, D.; Zhang, Z., A cell-specific poly(ethylene glycol) derivative with a wheat-like structure for efficient gene delivery. *Mol Pharm* **2012**, 9, (11), 2974-2985.
49. Balakirev, M.; Schoehn, G.; Chroboczek, J., Lipoic acid-derived amphiphiles for redox-controlled DNA delivery. *Chem Biol* **2000**, 7, (10), 813-819.
50. Parhiz, H.; Shier, W. T.; Ramezani, M., From rationally designed polymeric and peptidic systems to sophisticated gene delivery nano-vectors. *Int J Pharm* **2013**, 457, (1), 237-259.
51. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y., Arginine-rich peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **2001**, 276, (8), 5836-5840.
52. Mann, A.; Thakur, G.; Shukla, V.; Ganguli, M., Peptides in DNA delivery: Current insights and future directions. *Drug Discov Today* **2008**, 13, (3-4), 152-160.
53. McKenzie, D. L.; Collard, W. T.; Rice, K. G., Comparative gene transfer efficiency of low molecular weight polylysine DNA-condensing peptides. *J Pept Res* **1999**, 54, (4), 311-318.
54. Mann, A.; Thakur, G.; Shukla, V.; Singh, A. K.; Khanduri, R.; Naik, R.; Jiang, Y.; Kalra, N.; Dwarakanath, B. S.; Langel, U.; Ganguli, M., Differences in DNA condensation and release by lysine and arginine homopeptides govern their DNA delivery efficiencies. *Mol Pharm* **2011**, 8, (5), 1729-1741.
55. Mitchell, D. J.; Steinman, L.; Kim, D. T.; Fathman, C. G.; Rothbard, J. B., Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res* **2000**, 56, (5), 318-325.
56. Herce, H. D.; Garcia, A. E.; Cardoso, M. C., Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. *JACS* **2014**, 136, (50), 17459-17467.
57. Wexselblatt, E.; Esko, J. D.; Tor, Y., On guanidinium and cellular uptake. *J Org Chem* **2014**, 79, (15), 6766-6774.
58. Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B., The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97, (24), 13003-13008.
59. Futaki, S.; Ohashi, W.; Suzuki, T.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Harashima, H.; Sugiura, Y., Stearylarginine-rich peptides: A new class of transfection systems. *Bioconjug Chem* **2001**, 12, (6), 1005-1011.
60. Lehto, T.; Abes, R.; Oskolkov, N.; Suhorutsenko, J.; Copolovici, D.-M.; Mäger, I.; Viola, J. R.; Simonson, O. E.; Ezzat, K.; Guterstam, P.; Eriste, E.; Smith, C. I. E.; Lebleu, B.; Samir, E. L. A.; Langel, U., Delivery of nucleic acids with a stearylarginine (R_xR)₄ peptide using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* **2010**, 141, (1), 42-51.
61. Furuhashi, M.; Kawakami, H.; Toma, K.; Hattori, Y.; Maitani, Y., Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine-linked PEG-lipids: Effect of oligo-arginine length. *Int J Pharm* **2006**, 316, (1-2), 109-116.

62. Obata, Y.; Suzuki, D.; Takeoka, S., Evaluation of cationic assemblies constructed with amino acid based lipids for plasmid DNA delivery. *Bioconjug Chem* **2008**, 19, (5), 1055-1063.
63. Arnér, E. S. J.; Nordberg, J.; Holmgren, A., Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, 225, (1), 268-274.
64. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **1970**, 34, (2), 595-598.
65. Biewenga, G. P.; Haenen, G. R. M. M.; Bast, A., An Overview of Lipoate Chemistry. Fuchs, J.; Packer, L.; Zimmer, G. eds. *Lipoic Acid in Health and Disease*, Marcel Dekker, NewYork, **1997**, 1-32.
66. Endo, K.; Shiroy, T.; Murata, N.; Kojima, G.; Yamanaka, T., Synthesis and characterization of poly(1,2-dithiane). *Macromolecules* **2004**, 37, (9), 3143-3150.
67. Cleland, W. W., Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **1964**, 3, (4), 480-482.
68. Millis, K. K.; Weaver, K. H.; Rabenstein, D. L., Oxidation/reduction potential of glutathione. *J Org Chem* **1993**, 58, (15), 4144-4146.
69. Szajewski, R. P.; Whitesides, G. M., Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione. *JACS* **1980**, 102, (6), 2011-2026.
70. Roy, S.; Packer, L., Redox regulation of cell functions by α -lipoate: Biochemical and molecular aspects. *BioFactors* **1998**, 7, (3), 263-267.
71. Krishnan, C. V.; Garnett, M., Electrochemical behavior of the super antioxidant, α -lipoic acid. *Int J Electrochem Sci* **2011**, 6, 3607-3630.
72. Dauty, E.; Remy, J.-S.; Blessing, T.; Behr, J. P., Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture. *JACS* **2001**, 123, (38), 9227-9234.
73. Boussif, O.; Gaucheron, J.; Boulanger, C.; Santaella, C.; Kolbe, H. V.; Vierling, P., Enhanced in vitro and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid. *J Gene Med* **2001**, 3, (2), 109-114.
74. Meldal, M.; Tornøe, C. W., Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem Rev* **2008**, 108, (8), 2952-3015.
75. Méndez-Ardoy, A.; Guilloteau, N.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Santoyo-González, F.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M., β -cyclodextrin-based polycationic amphiphilic "Click" clusters: Effect of structural modifications in their DNA complexing and delivery properties. *J Org Chem* **2011**, 76, (15), 5882-5894.
76. Lee, J. W.; Kim, B.-K.; Kim, H. J.; Han, S. C.; Shin, W. S.; Jin, S.-H., Convergent synthesis of symmetrical and unsymmetrical PAMAM dendrimers. *Macromolecules* **2006**, 39, (6), 2418-2422.
77. Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A., Chemical vectors for gene delivery: A current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol* **2009**, 157, (2), 166-178.
78. Santaella, C.; Vierling, P.; Riess, J. G., New perfluorinated phospholipids as injectable amphiphiles: Synthesis, preliminary physicochemical and biocompatibility data. *New J Chem* **1991**, 15, 685-692.
79. Pérez-Balderas, F.; Ortega-Muñoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernández-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asín, J. A.; Isac-García, J.; Santoyo-González, F., Multivalent neoglycoconjugates by regiospecific cycloaddition of alkynes and azides using organic-soluble copper catalysts. *Org Lett* **2003**, 5, (11), 1951-1954.
80. El Akri, K.; Bougrin, K.; Balzarini, J.; Faraj, A.; Benhida, R., Efficient synthesis and in vitro cytostatic activity of 4-substituted triazolyl-nucleosides. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, (23), 6656-6659.
81. Chattopadhyay, A.; London, E., Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal Biochem* **1984**, 139, (2), 408-412.
82. Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **1959**, 82, (1), 70-77.

83. Levison, M. E.; Josephson, A. S.; Kirschenbaum, D. M., Reduction of biological substances by water-soluble phosphines: Gamma-globulin (IgG). *Experientia* **1969**, 25, 126-127.
84. Vercauteren, D.; Rejman, J.; Martens, T. F.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K., On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods. *J Control Release* **2012**, 161, (2), 566-581.
85. Suh, J.; Wirtz, D.; Hanes, J., Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (7), 3878-3882.
86. Suh, J.; Paik, H. J.; Hwang, B. K., Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pH. *Bioorg Chem* **1994**, 22, (3), 318-327.
87. Brissault, B.; Kichler, A.; Guis, C.; Leborgne, C.; Danos, O.; Cheradame, H., Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjug Chem* **2003**, 14, (3), 581-587.

PARTIE III : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

I. SYNTHESSES

I.1 MODE OPERATOIRE GENERAL ET INSTRUMENTS

Les réactions sensibles à l'eau et/ou à l'oxygène de l'air ont été effectuées sous atmosphère inerte d'argon et dans des conditions anhydres. En ce qui concerne les réactions CuAAC relevant de la chimie Click, l'iodure de cuivre(I) et l'acide acétique ont été additionnés au milieu réactionnel à partir de solutions stock dans le THF. Les chromatographies ont été réalisées sur colonne en gel de silice 60 (Merck, 40-63 μm), sur résine d'exclusion Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) ou LH-60 (Amersham Pharmacia), ou sur plaque préparative à couche de silice 60 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich). Les dialyses ont nécessité des membranes de cellulose régénérée (RC) avec une limite d'exclusion (*cut-off*) de 1 kDa (Spectra/Por 7, Spectrum Labs). L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice 60 F₂₅₄ (Merck). La visualisation des spots a été réalisée sous lumière UV (254 nm), par des vapeurs d'iode (Sigma-Aldrich), ou à l'aide de révélateurs spécifiques : solution du réactif de Dragendorff (Sigma-Aldrich), de ninhydrine (Sigma-Aldrich), de vanilline (Sigma-Aldrich), d'acide sulfurique à 10%, ou encore d'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB ou réactif d'Ellman, Sigma-Aldrich). Les solvants et réactifs commerciaux ont été utilisés sans purification ultérieure.

Les spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{19}F ont été obtenus à 200 ou 500 MHz sur un appareil AC-200 ou AC-500 (Bruker), respectivement. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au chloroforme deutéré (CDCl_3), au méthanol deutéré (MeOD), à l'éthanol deutéré (EtOD), à l'oxyde de deutérium (D_2O) ou au diméthylsulfoxyde deutéré ($\text{DMSO}-d^6$).¹ Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz et la multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : s (singulet), br s (large singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), ddd (doublet dédoublé dédoublé), t (triplet), td (triplet dédoublé), q (quadruplet), quint (quintuplet), sext (sextuplet) et m (multiplet). Les signaux sont décrits comme suit : déplacement chimique (multiplicité, constante de couplage, intégration et assignation). En ce qui concerne les données ^{13}C , les carbones fixés aux atomes de fluor ont été omis, à cause de constantes de couplage $^1J_{\text{CF}}$ très grandes. Les spectres de masse théoriques ont été calculés en utilisant le logiciel IsoPro 3.1. Les spectres ESI-MS ou ESI-HRMS ont été enregistrés sur un spectromètre esquire 3000 plus (Bruker Daltonics) et LTQ/FT-Orbitrap (Thermo-Fischer Scientific), respectivement. Finalement, les spectres UV-visibles et ceux de fluorescence ont été réalisés sur un spectrophotomètre Cary 300 Scan (Varian) et LS-50B (Perkin-Elmer), respectivement.

Les réactifs listés ci-après ont pour origine la société Sigma-Aldrich : acide acétique, acide chlorhydrique, anhydride acétique, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP), *N*-hydroxysuccinimide (HOSu), hydroxybenzotriazole (HOBt), *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium

hexafluorophosphate (HBTU), acide Fmoc-L-aspartique 4-*tert*-butyl ester [Fmoc-Asp(OtBu)-OH], N_α -Fmoc- N_ω -(2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine [Fmoc-Arg(Pbf)-OH], N_α -Fmoc-S-trityl-L-cystéine [Fmoc-Cyst(Trt)-OH], *N*-Boc-1,6-diaminohexane, iodure de cuivre(I) (CuI), dithiothréitol (DTT), bromure d'éthidium (BET), triisopropylsilane (TIS), acide lipoïque, acide octanoïque, pipéridine, dodécylsulfate de sodium (SDS), acide trifluoroacétique (TFA), trifluoroéthanol (TFE) et propargylamine. La *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA), la résine 2-chlorotrityle, le triéthylène oxy [Fmoc-TEO-NH₂.HCl] et le polyéthylène glycol [N₃-PEG_{1,6K}-NH₂] ont été achetés à la société IRIS Biotech (Marktredwitz, Germany). Tris-acétate-EDTA provient de chez BioRad, JetPEI™ de chez Polyplus, et le polyéthylène glycol [H₂N-PEG_{5K}-OMe] (MW 5000 Da, n. 114) de chez Rapp Polymer (Tübingen, Germany).

Les acides 12,12,13,13,14,14,15,15,15-nonafluoropentadécanoïque (F-(CF₂)₄(CH₂)₁₀-COOH),² (R)-2,2-diméthylthiazolidine-4-carboxylique,³ 3-(12,12,13,13,14,14,15,15,15-nonafluoropentadécanoyl)-2,2-diméthyl-4(R)-thiazolidine-4-carboxylique [F₄C₁₀-CystDmt-OH],⁴ Fmoc-aspartique,⁵ et le peptide totalement protégé BS69^p terminé par une fonction acide carboxylique libre,⁶ ont été synthétisés suivant les protocoles rapportés dans la littérature.

I.2 PROCEDURES GENERALES DE SYNTHÈSE

I.2.1 SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE – PROTOCOLE 1

Etape 1, conditionnement de la résine : La résine 2-chlorotrityle (1eq, 0,78 mmol, 1 g) est mise à gonfler pendant 1 h 30 dans le DMF (6 mL) sous atmosphère inerte d'argon.

Etape 2, couplage du premier résidu : Après filtration du DMF, une solution contenant le résidu *N*-Fmoc à coupler (2 eq, 1,56 mmol) et la DIPEA (3 eq, 2,33 mmol, 406 µL) dans le DMF (6 mL) est ajoutée à la résine, puis l'ensemble est agité de façon orbitale pendant 1 h à température ambiante. Un second cycle de couplage est réalisé dans les mêmes conditions et la résine est lavée 3 fois au DMF, et 3 fois au CH₂Cl₂. Les sites actifs de la résine n'ayant pas réagi sont piégés grâce à une solution de DMF/MeOH 65:10 (v/v) (30 min) (étape de *capping*) pour limiter la formation de produits de délétion, puis la résine est à nouveau rincée 3 fois avec DMF et CH₂Cl₂, successivement.

Etape 3, élongation : Tout d'abord, les groupements Fmoc sont clivés par action d'une solution de DMF/pipéridine 4:1 (v/v) (4 x 4 mL, 10 min). Cette étape permet aussi de s'assurer de l'efficacité du couplage précédent par titration de l'adduit dibenzofulvène-pipéridine en UV à 290 nm.⁷ L'acide aminé *N*-Fmoc (2 eq, 1,56 mmol) et HOBt (3 eq, 2,33 mmol, 315 mg) sont ensuite solubilisés dans le DMF (6 mL). Lorsque la solution devient limpide, DIC (2,4 eq, 1,87 mmol, 279 µL) est ajouté puis le milieu est laissé sous agitation pendant 15 min. L'acide aminé activé est alors ajouté à la résine et l'ensemble est agité à température ambiante pendant 2 h. Le protocole est répété 2 fois dans les mêmes conditions, et la résine est lavée 3 fois au DMF et 3 fois au CH₂Cl₂. Par précaution, cette

dernière est aussi mise en contact avec une solution $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}/\text{DIPEA}$ 5:70:25 (v:v) (30 min) pour acétyler les éventuelles fonctions amines restantes, puis à nouveau lavée 3 fois avec DMF et CH_2Cl_2 , successivement.

Cette procédure, clivage du groupement Fmoc *N*-terminale de la chaîne en croissance, condensation de l'acide aminé *N*-Fmoc suivant, et *capping* des amines restantes, est répétée *n* fois jusqu'à l'obtention de la séquence peptidique désirée.

Etape 4, couplage du dernier résidu : Après régénération de la fonction *N*-terminale suivant le protocole décrit précédemment, le dérivé acide carboxylique devant terminer la chaîne (2 eq, 1,56 mmol) est introduit après activation grâce au couple DIC (2,4 eq, 1,87 mmol, 279 μL)/HOBt (3 eq, 2,33 mmol, 315 mg) dans le DMF (6 mL) (15 min). L'ensemble est agité de façon orbitale à température ambiante pendant 12 h, puis le cycle de condensation est répété 2 fois et la résine est lavée comme précédemment. Une dernière étape de *capping* de la résine avec l'anhydride acétique permet de terminer la synthèse.

Etape 4bis, acétylation : Dans ce cas, après clivage du groupement Fmoc comme précédemment, l'amine *N*-terminale de la chaîne en croissance est acétylée par un mélange Ac_2O (3 eq, 2,34 mmol) et DIPEA (5 eq, 3,90 mmol) dans le DMF (6 mL). Après 2 h d'agitation, un second cycle est réalisé et la résine est lavée 3 fois au DMF et 3 fois au CH_2Cl_2 .

Etape 5, clivage final : La séquence est décrochée de la résine dans des conditions acides douces à l'aide d'une solution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFE}/\text{acide acétique}$ 4:1:1 (v/v/v) (6 mL). Après 2 h sous agitation, le filtrat est récupéré et la résine est rincée 3 fois au CH_2Cl_2 . Le clivage est répété 1 fois dans les mêmes conditions, puis les filtrats sont rassemblés et évaporés sous pression réduite pour conduire au composé attendu.

Etape 5bis, clivage finale et déprotection totale : La séquence est décrochée de la résine et totalement déprotégée par action d'une solution TFA/ CH_2Cl_2 1:1 (v/v) contenant 5% (en volume) de TIS (2 mL) pendant 2 h à température ambiante (2 cycles). Le filtrat est récupéré et la résine est rincée 3 fois au CH_2Cl_2 . Après évaporation des filtrats sous pression réduite et co-évaporation du TFA en présence de cyclohexane (3 fois), le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice en milieu dégazé ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v + 0,1% TFA). Le produit est finalement repris dans du HCl 1N et lyophilisé.

Afin de s'assurer que l'élongation de la séquence est totale, deux tests sont réalisés après chaque étape de couplage :

- le test de Kaiser qui permet de vérifier l'absence d'amine libre sur la résine,
- l'analyse en spectrométrie de masse par décrochage de la molécule en croissance d'un aliquot de résine au moyen d'une solution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFE}/\text{acide acétique}$ 4:1:1 (v/v/v).

I.2.2 CYCLOADDITION 1,3-DIPOLAIRE AZOTURE/ALCYNE DE HUISGEN CATALYSEE PAR LE CUIVRE(I) (CUAAC) – PROTOCOL 2

Méthode A : À une solution du dérivé alcyne perfluoroalkylé (1 eq) et du dérivé azoture PEG_{1.6K} (1,2 eq) dans le THF sont ajoutés la DIPEA (5 eq), le CuI (1 eq) et l'acide acétique (1 eq). Le milieu réactionnel est agité au reflux du THF pendant une nuit ; le suivi CCM indique alors une conversion totale de l'alcyne. Après évaporation du THF sous pression réduite, le résidu brut est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8, v/v), puis par CCM préparative (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v).

Méthode B : À une solution du dérivé bis-alcyne perfluoroalkylé (1 eq) et du dérivé azoture PEG_{1.6K} (2,2 eq) dans le THF sont ajoutés la DIPEA (5 eq), le CuI (1 eq) et l'acide acétique (1 eq). Le milieu réactionnel est agité au reflux du THF pendant une nuit puis 1 eq de CuI est rajouté. Le mélange est laissé sous agitation à 70°C encore 24 h pour favoriser une double réaction CuAAC. Après évaporation du THF sous pression réduite, le résidu brut est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 (CH₂Cl₂/MeOH, 2:8, v/v), puis par CCM préparative (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v) (2 fois).

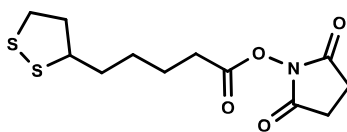
Remarque : En ce qui concerne les dérivés cystéine, la DIPEA est toujours ajoutée avant le PEG_{1.6K}.

I.3 PREPARATION DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE (PARTIE II, CHAPITRE II)

I.3.1 SYNTHÈSE DES AMPHIPHILES CATIONIQUES ET DES CONJUGUES PEGYLES NEUTRES

A. Synthèse du N-(6-aminohexyl)-1,2-dithiolane-3-pentanamide, Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** (chlorure)

Synthèse de l'acide 1,2-dithiolane-(3R)-pentanoïque, 2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl ester, **1a**



HOSu (1,5 eq, 14 mmol, 1,40 g) et DCC (1,3 eq, 12 mmol, 2,56 g) sont successivement ajoutés à une solution d'acide lipoïque (1 eq, 9,70 mmol, 2 g) dans le CH₂Cl₂ (10 mL), puis le mélange réactionnel est agité pendant 24 h à température ambiante sous argon et à l'abri de la lumière. Après filtration de la dicyclohexylurée sur célite, le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le solide est finalement trituré dans l'isopropanol préalablement chauffé à 40°C et à nouveau filtré pour conduire au composé **1a** sous la forme d'un solide jaune (2,29 g, 79 %).

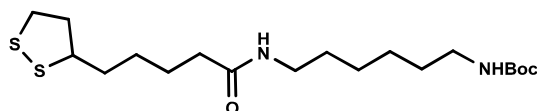
FB : C₁₂H₁₇NO₄S₂

PM : 303,40 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1, v/v) : 0,47

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 3,58 (quint, $^3J=6,7$ Hz, 1H, SCH), 3,25–3,05 (m, 2H, SCH_2), 2,84 (s, 4H, 2x CH_2 cyclique), 2,62 (t, 2H, $^3J=7,2$ Hz, CH_2CONH), 2,55–2,39 (sext, 1H, SCH_2CH_2), 2,00–1,84 (sext, 1H, SCH_2CH_2), 1,82–1,50 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CO}_2$).

Synthèse du *N*-[6-(tert-butoxycarbonamido)hexyl]-1,2-dithiolane-3-pentanamide, **2a**



L'acide activé **1a** (1 eq, 0,66 mmol, 200 mg) est ajouté à une solution de *N*-Boc-1,6-diaminohexane (1,2 eq, 0,79 mmol, 171 mg) et de DIPEA (1,5 eq, 0,99 mmol, 172 μL) dans le CH_2Cl_2 (20 mL). Après 24 h d'agitation à température ambiante, le milieu est successivement lavé avec une solution de KHSO_4 (0,1N), une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , et de l'eau. Après séchage sur MgSO_4 , filtration et concentration sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, v/v) pour conduire au composé **2a** sous la forme d'un solide jaune (230 mg, 87 %).

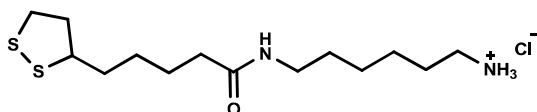
FB : $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$

PM : 404,63 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v): 0,57

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 5,80–5,50 (br s, 1H, NHCO), 4,70–4,40 (br s, 1H, NHBoc), 3,65–3,45 (quint, 1H, SCH), 3,30–3,05 (m, 6H, CH_2NHBoc , CONHCH_2 , SCH_2), 2,57–2,36 (sext, 1H, SCH_2CH_2), 2,20 (t, $^3J=7,2$ Hz, 2H, CH_2CONH), 2,00–1,81 (sext, 1H, SCH_2CH_2), 1,80–1,20 (m, 23H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CONH}$, 3x CH_3).

Synthèse du *N*-(6-aminohexyl)-1,2-dithiolane-3-pentanamide, $\text{Lip-C}_6\text{-NH}_3^+$ **3a** (chlorure)



Le composé **2a** (0,57 mmol, 231 mg) est ajouté à une solution préparée par addition de chlorure d'acétyle (15 eq, 8,57 mmol, 610 μL) à du méthanol anhydre (30 mL) à 0°C. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 5 h, puis concentré sous pression réduite. Le résidu est co-évaporé 6 fois avec du méthanol et 3 fois avec du chloroforme pour conduire au composé $\text{Lip-C}_6\text{-NH}_3^+$ **3a** (chlorure) sous la forme d'une huile jaune (182 mg, 93 %).

FB : $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{OS}_2$

PM : 340,98 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8:2, v/v) : 0,30

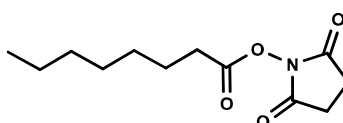
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 5,80–5,50 (br s, 1H, NHCO), 3,77–3,58 (m, 1H, SCH), 3,28–2,90 (m, 6H, CH_2NH_3^+ , CONHCH_2 , SCH_2), 2,57–2,38 (sext, 1H, SCH_2CH_2), 2,20 (t, 2H, $^3J=7,2$ Hz, CH_2CONH), 2,00–1,85 (sext, 1H, SCH_2CH_2), 1,75–1,25 (m, 14H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NH}_3^+$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CONH}$)

RMN ^{13}C (MeOD , 200 MHz) : δ (ppm) 172,89, 57,65, 41,43, 40,95, 40,37, 39,46, 36,93, 36,88, 35,75, 30,18, 29,89, 28,55, 27,43, 27,09, 26,87

ESI-MS (mode positif) : $m/z=305,1$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{OS}_2$ (304,16).

B. Synthèse du *N*-(6-aminohexyl)octanamide, *Oct-C}_6\text{-NH}_3^+* **3b** (sel de TFA)

Synthèse de l'acide octanoïque, 2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl ester, **1b**



HOSu (1,5 eq, 2,07 mmol, 238 mg) et DCC (1,3 eq, 1,80 mmol, 370 mg) sont successivement ajoutés à une solution d'acide octanoïque (1 eq, 1,38 mmol, 220 mL) dans le CH_2Cl_2 (5 mL), puis le mélange réactionnel est agité pendant 6 h à température ambiante sous argon. Après filtration de la dicyclohexylurée sur célite, le filtrat est évaporé sous pression réduite pour conduire au composé **1b** sous la forme d'un solide blanc (340 mg, Rdt quant).

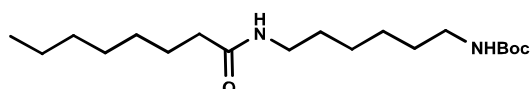
FB : $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

PM : 241,28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v): 0.47

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 2,78 (br s, 4H, $2\times\text{CH}_2$ cyclique), 2,54 (t, $^3J=7,4$ Hz, 2H, CH_2CO_2), 1,68 (quint, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$), 1,45–1,07 (m, 8H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 0,82 (t, $^3J=6,4$ Hz, 3H, CH_3CH_2).

Synthèse du *N*1-(octanoyl)-*N*5-[(*tert*-butoxy)carbonyl]-1,6-hexanediamine, **2b**



L'acide activé **1b** (1 eq, 1,57 mmol, 379 mg) est ajouté à une solution de *N*-Boc-1,6-diaminohexane (1,2 eq, 1,88 mmol, 408 mg) et de DIPEA (1,5 eq, 3,36 mmol, 411 μL) dans le CH_2Cl_2 (40 mL). Après 6 h d'agitation à température ambiante, le milieu est successivement lavé avec une solution de KHSO_4 (0,1N), une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 , et de l'eau. Après séchage sur MgSO_4 , filtration et concentration sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice (CH_2Cl_2) pour conduire au composé **2b** sous la forme d'un solide blanc (618 mg, 87 %).

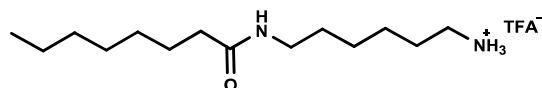
FB : $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3$

PM : 342,52 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v) : 0,73

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 5,60 (br s, 1H, CH_2CONH), 4,54 (br s, 1H, NHBoc), 3,23 (q, $^3J=6,4$ Hz, 2H, CONHCH_2), 3,10 (q, $^3J=6,3$ Hz, 2H, CH_2NHBoc), 2,15 (t, $^3J=7,4$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,76–1,55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 1,43 (m, 13H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$, $3\times\text{CH}_3$), 1,38–1,19 (m, 12H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$, $(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{NHBoc}$), 0,87 (t, $^3J=6,3$ Hz, 3H, CH_3CH_2).

Synthèse du *N*-(6-aminohexyl)octanamide, $\text{Oct-C}_6\text{-NH}_3^+$ **3b** (sel de TFA)



Le composé **2b** (0,29 mmol, 100 mg) est agité pendant 3 h en milieu TFA/ CH_2Cl_2 1:1 (v/v), i.e. jusqu'à disparition totale sur CCM. Après concentration sous pression réduite, le résidu est co-éaporé plusieurs fois avec du cyclohexane et du CH_2Cl_2 . Le brut est finalement précipité dans Et_2O et filtré pour conduire au composé $\text{Oct-C}_6\text{-NH}_3^+$ **3b** (sel de TFA) sous la forme d'un solide blanc (103 mg, 99 %).

FB : $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$

PM : 356,42 g.mol $^{-1}$

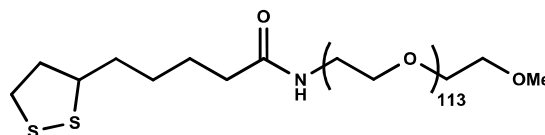
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,33

RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) 3,16 (t, $^3J=6,8$ Hz, 2H, CONHCH_2), 2,67 (t, $^3J=7,0$ Hz, 2H, CH_2NH_3^+), 2,17 (t, $^3J=7,4$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,71–1,45 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1,45–1,23 (m, 12H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$, $(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$), 0,90 (t, $^3J=6,4$ Hz, 3H, CH_3CH_2)

RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) 176,36, 40,63, 40,00, 37,15, 32,88, 30,24, 30,18, 30,11, 28,44, 27,30, 27,11, 26,96, 23,05, 14,41

ESI-MS (mode positif): $m/z=243,1$ et $265,3$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$ (242,24).

*C. Synthèse de l' α -[2-[1,2-dithiolane-3-pentanoyl]amino]éthyl]- ω -méthoxy-poly(oxy-1,2-éthanediyl), Lip-PEG $_{5K}$ -OMe **4a***



Une solution contenant $\text{H}_2\text{N-PEG}_{5K}\text{-OMe}$ (1 eq, 0,03 mmol, 150 mg) et DIPEA (1,5 eq, 0,05 mmol, 8 μL) dans le CH_2Cl_2 (2,5 mL) est ajoutée en 5 fois à une solution de l'acide activé **1a** (1,5 eq, 0,05 mmol, 15,2 mg) également dans le CH_2Cl_2 (2,5 mL). Après consommation totale du polyéthylène glycol (suivi CCM), le mélange réactionnel est concentré jusqu'à un minimum de CH_2Cl_2 . L'addition d'un grand volume d' Et_2O entraîne alors la précipitation concomitante du composé **1a** et du produit de couplage Lip-PEG $_{5K}$ -OMe **4a**. Le solide est filtré, lavé avec Et_2O froid et séché sous vide. Le mélange est ensuite

séparé par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 (CH₂Cl₂/MeOH 2:8, v/v) pour conduire au conjugué Lip-PEG_{5K}-OMe **4a** sous la forme d'un solide blanc (143 mg, 90 %).

FB : C₂₃₉H₄₇₇NO₁₁₆S₂ (*n*=114)

PM : 5285,41

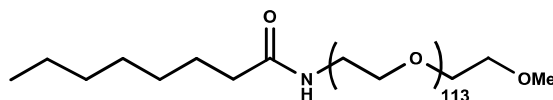
R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,40

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 6,25 (s, 1H, NH), 4,04–3,05 (m, 462H, CH₂CH₂O, OCH₃, SCH, SCH₂), 2,57–2,36 (sext, 1H, SCH₂CH₂), 2,20 (t, ³J=7,2 Hz, 2H, CH₂CONH), 2,00–1,81 (sext, 1H, SCH₂CH₂), 1,82–1,50 (m, 6H, (CH₂)₃CH₂CONH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 173,20, 72,31, 71,25, 70,94, 70,59, 70,34, 59,42, 56,82, 40,62, 39,54, 38,85, 36,69, 35,06, 29,32, 25,77

ESI-HRMS (mode positif) : m/z=1343,5122, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+4Na]⁴⁺, avec M=C₂₃₉H₄₇₇NO₁₁₆S₂ (5282,0894, pour *n*=114).

*D. Synthèse de l'α-[2-[(octanoyl)amino]éthyl]-ω-méthoxy-poly(oxy-1,2-éthanediyl), Oct-PEG_{5K}-OMe **4b***



Le protocole est identique à celui suivi pour la préparation du conjugué Lip-PEG_{5K}-OMe **4a**, avec H₂N-PEG_{5K}-OMe (1 eq, 0,03 mmol, 150 mg), DIPEA (1,5 eq, 0,05 mmol, 8 μL), et l'acide activé **1b** (1,5 eq, 0,05 mmol, 12 mg). Après traitement, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique LH-60 pour conduire au conjugué Oct-PEG_{5K}-OMe **4b** sous la forme d'un solide blanc (168 mg, 92 %).

FB : C₂₃₉H₄₇₉NO₁₁₆ (*n*=114)

PM : 5223,30

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,43

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 6,23 (s, 1H, NH), 4,04–3,21 (m, 456H, CH₂CH₂O, OCH₃), 2,15 (t, ³J=7,5 Hz, 2H, CH₂CO), 1,65–1,46 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1,34–1,12 (m, 8H, CH₃(CH₂)₄), 0,85 (t, ³J=6,7 Hz, 3H, CH₃CH₂)

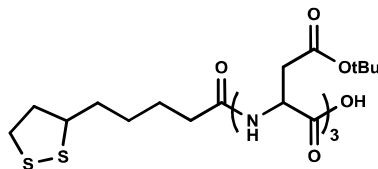
RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 173,19, 71,79, 71,47, 70,63, 70,42, 70,05, 69,87, 58,89, 38,99, 36,55, 31,59, 29,16, 28,91, 25,62, 22,47, 13,95

ESI-HRMS (mode positif) : m/z=1682,3593, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+3H]³⁺, avec M=C₂₃₁H₄₆₃NO₁₁₂ (5044,0562, pour *n*=110).

I.3.2 SYNTHÈSE DES CONJUGUES PEGYLES POLYANIONIQUES

A. Synthèse du Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)**

Synthèse du Lip-[Asp(OtBu)]₃-OH **7a(p₃)**



Le composé **7a(p₃)** a été obtenu suivant le protocole 1 (cf. **paragraphe I.2.1**) : étape 2 : Fmoc-Asp(OtBu)-OH (2 eq, 1,56 mmol, 642 mg) ; étape 3 : n = 2 cycles ; étape 4 modifiée : Après régénération de la fonction N-terminale de la chaîne en croissance, une solution d'acide lipoïque activé **1a** (2 eq, 1,56 mmol, 472 mg), de DIPEA (2 eq, 1,56 mmol, 272 µL) et de DMAP (0,1 eq, 0,08 mmol, 9,52 mg) dans le CH₂Cl₂ (6 mL) est ajoutée à la résine. L'ensemble est agité de façon orbitaire à température ambiante pendant 2 h, puis le cycle de condensation est répété 2 fois et la résine est lavée 3 fois avec CH₂Cl₂ et DMF. Une dernière étape de *capping* précède le clivage final décrit dans l'étape 5. On obtient le composé **7a(p₃)** sous la forme d'une huile jaune (540 mg, 96%).

FB : C₃₂H₅₃N₃O₁₁S₂

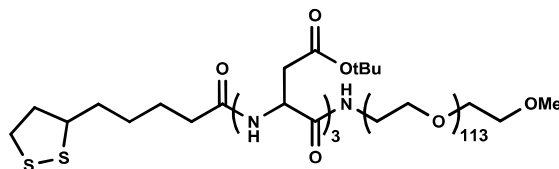
PM : 719,91 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,63

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 7,58 (d, ³J=8,2 Hz, 1H, NHCHCO), 7,53 (d, ³J=8,2 Hz, 2H, NHCHCO), 6,87 (d, ³J=8,0 Hz, 1H, CH₂CONH), 4,80–4,71 (m, 2H, NHCHCO), 3,58 (quint, ³J=6,7 Hz, 1H, SCH), 3,24–3,03 (m, 2H, SCH₂), 2,82–2,77 (m, 4H, 2xCH₂CO₂tBu), 2,71–2,65 (m, 2H, CH₂CO₂tBu), 2,53–2,37 (sext, 1H, SCH₂CH₂), 2,25 (t, ³J=7,3 Hz, 2H, CH₂CONH), 1,98–1,81 (sext, 1H, SCH₂CH₂), 1,75–1,59 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CO), 1,43 (br s, 29 H, CH₂(CH₂)₂CO et 9xCH₃)

ESI-MS (mode positif) : m/z=720,5 et 742,5, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+H]⁺ et [M+Na]⁺, respectivement avec M=C₃₂H₅₃N₃O₁₁S₂ (719,31).

Synthèse du Lip-[Asp(OtBu)]₃-PEG_{5K}-OMe **8a(p₃)**



A une solution de **7a(p₃)** (1,5 eq, 0,03 mmol, 21,6 mg) dans le CH₂Cl₂ (2,5 mL) sont successivement ajoutés HOBt (2,5 eq, 0,05 mmol, 5,9 mg) et DIC (2 eq, 0,04 mmol, 6 µL). Le milieu est agité à température ambiante pendant 15 min. Une solution contenant H₂N-PEG_{5K}-OMe (1 eq, 0,02 mmol, 99,6 mg) et DIPEA (2 eq, 0,04 mmol, 7 µL) dans le CH₂Cl₂ (2,5 mL) est ensuite ajoutée en 5 fois à la

solution d'acide activé. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à consommation totale du polyéthylène glycol (suivi CCM). Après concentration du milieu jusqu'à un minimum de CH_2Cl_2 , l'addition d'un grand volume d' Et_2O entraîne la précipitation simultanée du composé **7a(p₃)** et du produit de couplage Lip-[Asp(OtBu)]₃-PEG_{5K}-OMe **8a(p₃)**. Le solide est filtré, lavé avec Et_2O froid et séché sous vide. Le mélange est ensuite séparé par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2:8, v/v) pour conduire au conjugué **8a(p₃)** sous la forme d'un solide blanc (88 mg, 77 %).

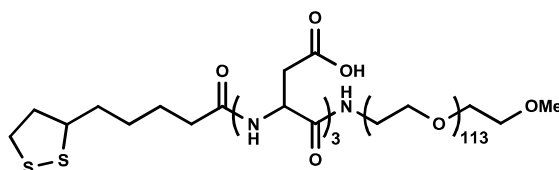
FB : $\text{C}_{261}\text{H}_{512}\text{N}_4\text{O}_{124}\text{S}_2$ ($n=114$)

PM : 5754,94

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,52

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 7,52–7,41 (m, 2H, NHCHCO), 6,94 (br t, 1H, CONHPEG), 6,78 (d, $^3J=7,8$ Hz, 1H, CH_2CONH), 4,77–4,56 (m, 3H, NHCHCO), 3,98–3,23 (m, 457H, SCH et $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,19–3,04 (m, 2H, SCH_2), 3,35 (s, 3H, OCH_3), 2,90–2,55 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 2,48–2,39 (m, 1H, SCH_2CH_2), 2,22 (t, $^3J=7,7$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,92–1,82 (m, 1H, SCH_2CH_2), 1,75–1,56 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,41 (br s, 29H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ et $9\times\text{CH}_3$).

Synthèse du Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)**



Les fonctions acides carboxyliques du composé **8a(p₃)** (87,4 mg, 0,02 mmol) sont régénérées au moyen d'une solution TFA/ CH_2Cl_2 1:1 (2 mL), le milieu étant placé sous agitation à température ambiante pendant 3 h (suivi CCM). Après concentration sous pression réduite, le résidu est co-évaporé plusieurs fois avec du cyclohexane et du CH_2Cl_2 pour conduire au conjugué Lip-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9a(p₃)** sous la forme d'un solide blanc (77 mg, 70 %).

FB : $\text{C}_{249}\text{H}_{488}\text{N}_4\text{O}_{124}\text{S}_2$ ($n=114$)

PM : 5586,62 g.mol⁻¹

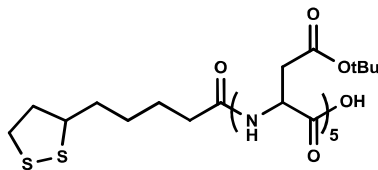
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v): 0,05

RMN ^1H (D_2O , 200 MHz) : δ (ppm) 4,62–4,47 (m, 3H, NHCHCO), 3,21 (s, 3H, OCH_3), 3,98–3,09 (m, 457H, SCH et $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,09–2,98 (m, 2H, SCH_2), 2,83–2,63 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2,42–2,25 (m, 1H, SCH_2CH_2), 2,23–2,07 (m, 2H, CH_2CONH), 1,93–1,78 (m, 1H, SCH_2CH_2), 1,57–1,21 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CO}$)
 RMN ^{13}C (D_2O , 200 MHz) : δ (ppm) 177,07, 174,31, 174,29, 172,93, 172,84, 172,33, 172,19, 71,43, 71,05, 70,66, 70,33, 70,02, 69,87, 69,12, 58,49, 56,93, 50,69, 50,51, 50,45, 40,70, 39,57, 38,57, 35,88, 35,74, 35,53, 34,21, 28,31, 25,32

ESI-HRMS (mode négatif) : $m/z=2680,4989$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$, avec $\text{M}=\text{C}_{239}\text{H}_{468}\text{N}_4\text{O}_{119}\text{S}_2$ (5363,0132 pour $n=109$).

B. Synthèse du Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**

Synthèse du Lip-[Asp(OtBu)]₅-OH **7a(p₅)**



De la même façon que pour la préparation de **7a(p₃)**, le composé **7a(p₅)** a été obtenu sur support solide 2-chlorotrityle (1 eq, 0,78 mmol, 1 g), avec n = 4 cycles (étape 3). On obtient le composé **7a(p₅)** sous la forme d'un solide blanc (751 mg, 92%).

FB : C₄₈H₇₉N₅O₁₇S₂

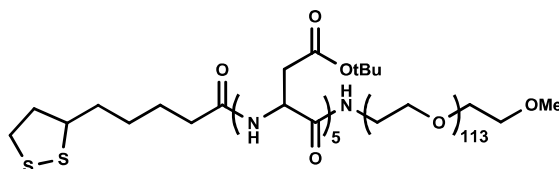
PM : 1062,29 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,55

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 7,61 (d, ³J=7,4 Hz, 2H, NHCHCO), 7,48 (d, ³J=8,4 Hz, 1H, NHCHCO), 7,42 (d, ³J=6,8 Hz, 1H, NHCHCO), 6,97 (d, ³J=7,6 Hz, 1H, CH₂CONH), 4,81–4,70 (m, 2H, NHCHCO), 4,70–4,56 (m, 3H, NHCHCO), 3,69–3,50 (m, 1H, SCH), 3,21–3,04 (m, 2H, SCH₂), 2,86–2,68 (m, 10H, 5xCH₂CO₂tBu), 2,53–2,38 (sext, 1H, SCH₂CH₂), 2,26 (t, ³J=7,1 Hz, 2H, CH₂CONH), 2,00–1,82 (sext, 1H, SCH₂CH₂), 1,78–1,58 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CO), 1,42 (br s, 47H, CH₂(CH₂)₂CO et 9xCH₃)

ESI-MS (mode positif) : m/z=1084,8, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+Na]⁺, avec M=C₄₈H₇₉N₅O₁₇S₂ (1061,49).

Synthèse du Lip-[Asp(OtBu)]₅-PEG_{5K}-OMe **8a(p₅)**



De la même façon que pour la préparation de **8a(p₃)**, **7a(p₅)** (1,5 eq, 0,05 mmol, 47,8 mg), HOBt (2,5 eq, 0,08 mmol, 10,1 mg) et DIC (2 eq, 0,06 mmol, 9,4 µL) sont mis à réagir avec H₂N-PEG_{5K}-OMe (1 eq, 0,03 mmol, 150 mg) en présence de DIPEA (2 eq, 0,06 mmol, 10,5 µL) pour conduire au conjugué **8a(p₅)** sous la forme d'un solide blanc (141 mg, 78 %).

FB : C₂₇₇H₅₃₈N₆O₁₃₀S₂ (n=114)

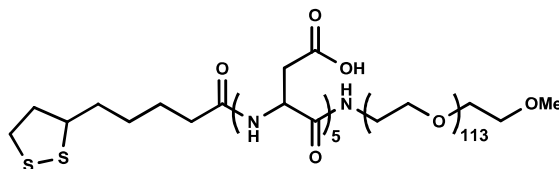
PM : 6097,33 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,44

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 7,67–7,54 (m, 2H, NHCHCO), 7,51–7,37 (m, 2H, NHCHCO), 7,10–6,90 (m, 2H, CH₂CONH et CONHPEG), 4,81–4,67 (m, 2H, NHCHCO), 4,67–4,52 (m, 3H, NHCHCO), 4,01–3,20 (m, 457H, SCH et CH₂CH₂O), 3,37 (s, 3H, OCH₃), 3,20–3,06 (m, 2H, SCH₂), 2,92–2,67 (m,

10H, 5xCH₂CO₂tBu), 2,51–2,36 (sext, 1H, SCH₂CH_{2b}), 2,25 (t, 2H, ³J=6,9 Hz, CH₂CONH), 1,94–1,80 (m, 1H, SCH₂CH_{2a}), 1,76–1,59 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂CO), 1,43 (br s, 47H, CH₂(CH₂)₂CO et 9xCH₃).

Synthèse du Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)**



De la même façon que pour la préparation de **9a(p₃)**, les fonctions acides carboxyliques du composé **8a(p₅)** sont régénérées en milieu acide pour conduire au conjugué Lip-Asp₅-PEG_{5K}-OMe **9a(p₅)** sous la forme d'un solide blanc (90 %).

FB : C₂₅₇H₄₉₈N₆O₁₃₀S₂ (n=114)

PM : 5816,80 g.mol⁻¹

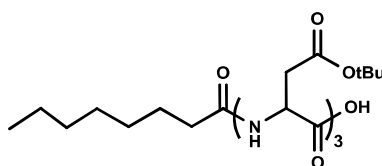
RMN ¹H (D₂O, 200 MHz) : δ (ppm) 4,61–4,43 (m, 5H, NHCHCO), 3,20 (s, 3H, OCH₃), 3,99–3,11 (m, 457H, SCH et CH₂CH₂O), 3,10–3,00 (m, 2H, SCH₂), 2,88–2,52 (m, 10H, CH₂CO₂H), 2,45–2,24 (m, 1H, SCH₂CH₂), 2,23–2,09 (m, 2H, CH₂CONH), 1,89–1,66 (m, 1H, SCH₂CH₂), 1,62–1,01 (m, 6H, (CH₂)₃CH₂CO)

RMN ¹³C (D₂O, 200MHz) : δ (ppm) 177,24, 175,24, 175,17, 175,06, 173,14, 172,81, 172,67, 172,55, 71,39, 71,03, 70,63, 70,31, 69,99, 69,84, 69,08, 58,49, 58,45, 56,88, 51,08, 50,99, 50,90, 50,86, 50,76, 40,67, 39,53, 38,49, 36,59, 36,39, 36,24, 36,10, 35,54, 34,12, 28,23, 25,28

ESI-HRMS (mode négatif) : m/z=2839,5520, en accord avec la masse exacte calculée pour [M-2H]²⁻, avec M=C₂₅₁H₄₈₆N₆O₁₂₇S₂ (5681,1191 pour n=111).

C. Synthèse de l'Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)**

Synthèse de l'Oct-[Asp(OtBu)]₃-OH, **7b(p₃)**



De la même façon que pour la préparation de **7a(p₃)**, le composé **7b(p₃)** a été obtenu sur support solide 2-chlorotrityle (1 eq, 0,78 mmol, 1 g), à partir de l'acide octanoïque activé **1b** (étape 4). On obtient le composé **7b(p₃)** sous la forme d'un solide jaune (496 mg, 98%).

FB : C₃₂H₅₅N₃O₁₁

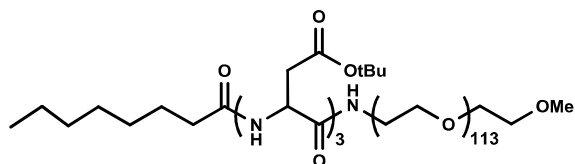
PM : 657,79 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,45

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 7,61 (d, ³J=7,8 Hz, 1H, NHCHCO), 7,54 (d, ³J=7,8 Hz, 1H, NHCHCO), 6,60 (d, ³J=7,6 Hz, 1H, CH₂CONH), 4,83–4,68 (m, 3H, NHCHCO), 2,81 (br t, 4H, 2xCH₂CO₂tBu), 2,67 (br

t, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 2,23 (t, $^3J=7,60$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,71–1,52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,36–1,20 (m, 8H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 1,43 (s, 27H, $9\times\text{CH}_3\text{C}$), 0,86 (t, $^3J=6,4$ Hz, 3H, CH_3CH_2)
ESI-MS (mode positif) : $m/z=658,1$ et $680,0$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$, respectivement avec $\text{M}=\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{11}$ (657,38).

Synthèse de l'Oct-[Asp(OtBu)]₃-PEG_{5K}-OMe **8b(p₃)**



De la même façon que pour la préparation de **8a(p₃)**, **7b(p₃)** (1,5 eq, 0,05 mmol, 30 mg), HOBt (2,5 eq, 0,08 mmol, 10,1 mg) et DIC (2 eq, 0,06 mmol, 9,4 μL) sont mis à réagir avec $\text{H}_2\text{N-PEG}_{5\text{K}}\text{-OMe}$ (1 eq, 0,03 mmol, 150 mg) en présence de DIPEA (2 eq, 0,06 mmol, 10,5 μL) pour conduire au conjugué **8b(p₃)** sous la forme d'un solide blanc (159 mg, 89 %).

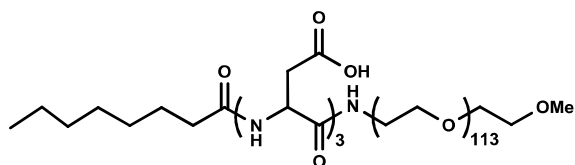
FB : $\text{C}_{261}\text{H}_{514}\text{N}_4\text{O}_{124}$ ($n=114$)

PM : $5692,83 \text{ g.mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,40

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) 7,49 (d, $^3J=8,4$ Hz, 1H, NHCHCO), 7,47 (d, $^3J=8,0$ Hz, 1H, NHCHCO), 6,95 (t, $^3J=5,2$ Hz, 1H, CONHPEG), 6,73 (d, $^3J=7,6$ Hz, 1H, CH_2CONH), 4,76–4,56 (br s, 3H, NHCHCO), 3,99–3,22 (m, 459H, OCH_3 et $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,91–2,56 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 2,21 (t, $^3J=7,6$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,69–1,52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,35–1,18 (m, 8H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 1,42 (s, 27H, $9\times\text{CH}_3\text{C}$), 0,85 (t, $^3J=6,4$ Hz, 3H, CH_3CH_2).

Synthèse de l'Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)**



De la même façon que pour la préparation de **9a(p₃)**, les fonctions acides carboxyliques du composé **8b(p₃)** sont régénérées en milieu acide pour conduire au conjugué Oct-Asp₃-PEG_{5K}-OMe **9b(p₃)** sous la forme d'un solide blanc (70 %).

FB : $\text{C}_{249}\text{H}_{490}\text{N}_4\text{O}_{124}$ ($n=114$)

PM : $5524,51 \text{ g.mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,36

RMN ^1H (D_2O , 200 MHz) : 4,53 (m, 3H, NHCHCO), 3,99–3,12 (m, 459H, OCH_3 et $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2,86–2,54 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2,11 (t, $^3J=7,6$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,51–1,30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,09 (m, 8H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 0,68 (t, $^3J=5,6$ Hz, 3H, CH_3CH_2)

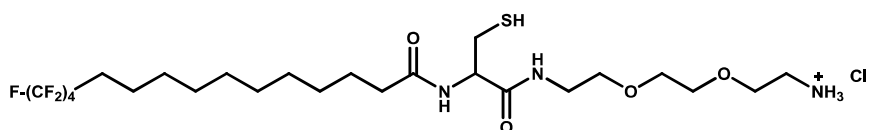
RMN ^{13}C (D_2O , 200 MHz) : δ (ppm) 177,67, 174,35, 174,31, 172,90, 172,39, 172,35, 172,23, 71,38, 70,97, 70,25, 69,98, 69,83, 69,08, 58,44, 50,67, 50,47, 50,40, 39,53, 35,84, 35,77, 35,68, 35,45, 31,37, 28,51, 28,49, 25,61, 22,37, 13,81

ESI-HRMS (mode négatif) : $m/z=2737,5940$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$, avec $\text{M}=\text{C}_{247}\text{H}_{486}\text{N}_4\text{O}_{123}$ (5477,1890 pour $n=113$).

I.4 PREPARATION DES DERIVES MONO- ET BIS-CYSTEINE (PARTIE II, CHAPITRE III)

I.4.1 SYNTHÈSE DE L'AMPHIPHILE CATIONIQUE

Synthèse du *N*-(1-(2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthylamino)-3-mercaptopropyl)-12,12,13,13,14,14,15,15,15-nonafluoropentadécaneamide, F_4C_{10} -Cyst-TEO- NH_3^+ **13** (chlorure)



Le composé **13** (chlorure) a été obtenu suivant le protocole 1 (cf. **paragraphe I.2.1**) modifié : étape 1 : résine (1 eq, 0,20 mmol, 250 mg) ; étape 2 : Fmoc-TEO- NH_2 (chlorure) (1,5 eq, 0,30 mmol, 119 mg) avec DIPEA (4 eq, 0,78 mmol, 136 μL) ; étape 3 : Fmoc-Cys(Trt)-OH (2 eq, 0,39 mmol, 229 mg) et $n = 1$ cycle ; étape 4 : $\text{F}-(\text{CF}_2)_4(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ (2 eq, 0,39 mmol, 168 mg) ; clivage final suivant l'étape 5bis. On obtient le composé **13** sous la forme d'un solide blanc (95 mg, 72%).

FB : $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{ClF}_9\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$

PM : 674,10 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,19

RMN ^1H (EtOD, 500 MHz) : δ (ppm) 4,48 (t, $^3J=6,5$ Hz, 1H, NHCHCO), 3,76 (t, $^3J=5,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 3,70–3,64 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), ~3,57 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$ masqué par les signaux résiduels de EtOD non deutéré), 3,46 et 3,39 (2td, $^3J=14,0$, $^3J=5,5$ Hz, 2H, CONHCH_2), 3,15 (t, $^3J=4,9$ Hz, 2H, CH_2NH_3^+), 2,90 (dd, $^2J=13,7$ Hz, $^3J=5,8$ Hz, 1H, CH_2SH), 2,80 (dd, $^2J=13,7$ Hz, $^3J=7,2$ Hz, 1H, CH_2SH), 2,31 et 2,30 (2t, $^3J=7,5$ Hz, 2H, CH_2CO), 2,14 (t, $^3J=8,5$ Hz, 2H, CF_2CH_2), 1,70–1,60 (m, 4H, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ et $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,48–1,31 (m, 12H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$)

RMN ^{13}C (EtOD, 200 MHz) : δ (ppm) 175,03, 171,46, 70,44, 69,57, 66,99, 56,76, 39,68, 39,33, 35,95, 30,83, 29,62, 29,53, 29,46, 29,38, 29,22, 25,96, 20,35

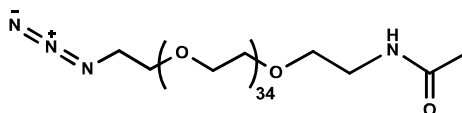
RMN ^{19}F (EtOD, 200 MHz) : δ (ppm) -82,7 (3F, CF_3), -115,8 (2F, CF_2CH_2), -125,7 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -127,4 (2F, CF_3CF_2)

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=638,2675$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{F}_9\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (637,2595).

I.4.2 SYNTHÈSE DES CONJUGUES PEGYLES MONO- ET BIS-CYSTEINE

I.4.2.1 PRÉPARATION DES SYNTHONS PEGYLES AZOTURES

A. Synthèse du N_3 -PEG_{1.6K}-Ac **14b**



A une solution de N_3 -PEG_{1.6K}-NH₂ (1 eq, 0,018 mmol, 30 mg) dans le DMF (500 μ L) sont ajoutés la DIPEA (5 eq, 0,092 mmol, 16 μ L) et l'anhydride acétique (3 eq, 0,055 mmol, 5,2 μ L). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit ; le suivi CCM indique alors une consommation totale du produit de départ. Après évaporation du DMF sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v) pour conduire au composé **14b** sous la forme d'un solide blanc (26 mg, 87%).

FB : C₇₄H₁₄₈N₄O₃₆

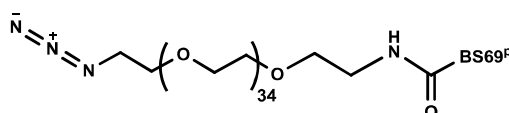
PM : 1669,99 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 95:5, v/v) : 0,32

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 6,80 (br s, 1H NH), 4,13–3,15 (m, 144H, CH₂CH₂O), 1,98 (s, 3H, CH₃CO)

ESI-MS (mode positif) : m/z =1692,2, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+Na]⁺, avec M=C₇₄H₁₄₈N₄O₃₆ (1668,99).

B. Synthèse du N_3 -PEG_{1.6K}-BS69^p **14a**



A une solution de peptide BS69^p libre à l'extrémité C-terminale (1 eq, 0,020 mmol, 55 mg) dans le DMF (1 mL) sont successivement ajoutés la DIPEA (3 eq, 0,061 mmol, 10,7 μ L) et HBTU (1,2 eq, 0,025 mmol, 9,3 mg). La fonction acide carboxylique est pré-activée pendant 3 min puis le composé N_3 -PEG_{1.6K}-NH₂ (1,5 eq, 0,031 mmol, 50 mg) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit ; le produit de départ est alors totalement consommé (suivi CCM). Après évaporation du DMF sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 (CH₂Cl₂/MeOH 2:8, v/v), puis par chromatographie sur colonne en gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 95:5, v/v) pour conduire au composé **14a** sous la forme d'un solide jaune (63 mg, 72%).

FB : C₂₁₄H₃₄₃N₂₅O₅₉S₃

PM : 4306,39 g.mol⁻¹

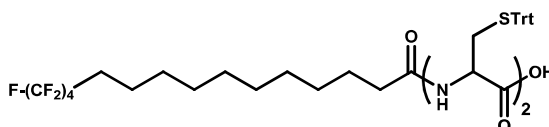
Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,43

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1087,8419$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(M+2H+2Na)/4]^{4+}$, avec $M=C_{214}H_{343}N_{25}O_{59}S_3$ (4303,3765).

I.4.2.2 PREPARATION DES SYNTHONS PEGYLES ALCYNES

A. Synthèse du $F_4C_{10}-[Cyst(Trt)]_2-CH_2CCH$ **22**

Synthèse du $F_4C_{10}-[Cyst(Trt)]_2-OH$ **18**



Le composé **18** a été obtenu suivant le protocole 1 (cf. **paragraphe I.2.1**) modifié : étape 1 : résine (1 eq, 0,39 mmol, 500 mg) ; étape 2 : Fmoc-Cyst(Trt)-OH (2 eq, 0,78 mmol, 457 mg) avec DIPEA (3 eq, 1,17 mmol, 204 μ L) ; étape 3 : Fmoc-Cys(Trt)-OH (2 eq, 0,78 mmol, 457 mg) et $n = 1$ cycle ; étape 4 : F-(CF₂)₄(CH₂)₁₀-COOH (2 eq, 0,78 mmol, 315 mg) ; l'étape 5 de clivage est suivie d'une purification du brut par chromatographie sur colonne en gel de silice (CH₂Cl₂/AcOEt 9:1, v/v). On obtient le composé **18** sous la forme d'un solide blanc (360 mg, 84%).

FB : C₅₉H₅₉F₉N₂O₄S₂

PM : 1095,24 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 95:5, v/v) : 0,24

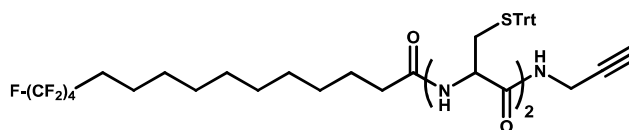
RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) : δ (ppm) 7,38 (d, $^3J=7,5$ Hz, 6H, *H*-Trt), 7,31 (d, $^3J=7,5$ Hz, 6H, *H*-Trt), 7,27–7,10 (m, 18H, *H*-Trt), 4,22–4,10 (m, 2H, NHCHCO), 2,68–2,49 (m, 4H, CH₂S), 2,25–1,95 (m, 4H, CH₂CO, CF₂CH₂), 1,66–1,47 (m, 4H, CH₂CH₂CO, CF₂CH₂CH₂), 1,40–1,17 (m, 12H, CF₂(CH₂)₂(CH₂)₆)

RMN ¹³C (MeOD, 500 MHz) : 176,53, 171,86, 146,20, 146,08, 130,88, 130,85, 129,19, 129,08, 128,06, 127,92, 68,17, 67,43, 54,34, 54,25, 37,04, 35,40, 34,53, 31,76, 30,70, 30,64, 30,59, 30,49, 30,41, 30,24, 27,06, 21,37

RMN ¹⁹F (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) -82,8 (3F, CF₃), -115,4 (2F, CF₂CH₂), -125,6 (2F, CF₃CF₂CF₂), -127,4 (2F, CF₃CF₂)

ESI-MS (mode positif) : $m/z=1117,5$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[M+Na]^+$, avec $M=C_{59}H_{59}F_9N_2O_4S_2$ (1094,38).

Synthèse du $F_4C_{10}-[Cyst(Trt)]_2-CH_2CCH$ **22**



A une solution de **18** (1 eq, 0,046 mmol, 50 mg) dans le DMF (1 mL) sont successivement ajoutés la DIPEA (2 eq, 0,091 mmol, 15,9 μ L), HOBT (1,5 eq, 0,068 mmol, 9,3 mg) et DIC (1,2 eq, 0,055 mmol, 8,5 μ L). Après activation de la fonction acide carboxylique pendant 30 min, la propargylamine (2 eq, 0,091 mmol, 5,8 μ L) est ajoutée et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Le suivi CCM indique alors une consommation totale du produit de départ. Après évaporation du DMF sous pression réduite, le brut est repris dans le CH_2Cl_2 , lavé avec une solution de NaCl saturée, séché sur $MgSO_4$ et filtré. Le résidu est finalement purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1, v/v) pour conduire au composé **22** sous la forme d'un solide blanc (38 mg, 71%).

FB : $C_{62}H_{62}F_9N_3O_3S_2$

PM : 1132,30 $g \cdot mol^{-1}$

Rf ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1, v/v) : 0,39

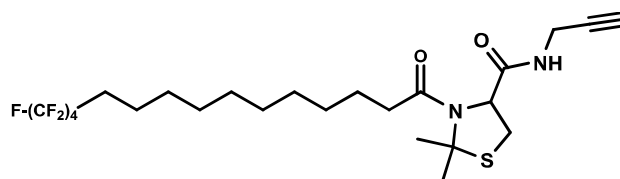
RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) : δ (ppm) 7,47–7,33 (m, 12H, *H*-Trt), 7,33–7,23 (m, 12H, *H*-Trt), 7,23–7,12 (m, 6H, *H*-Trt), 6,72 (t, $^3J=5,5$ Hz, 1H, $NHCH_2$), 5,88–5,81 (m, 2H, $NHCHCO$), 3,78–3,66 (m, 2H, CH_2CCH), 3,02 (dd, $^2J=13,0$ Hz, $^3J=6,0$ Hz, 1H, CH_2S), 2,67 (dd, 1H, $^2J=13,0$ Hz, $^3J=5,5$ Hz, 1H, CH_2S), 2,47 (dd, 1H, $^2J=13,0$ Hz, $^3J=5,5$ Hz, 1H, CH_2S), 2,38 (dd, 1H, $^2J=13,0$ Hz, $^3J=5,0$ Hz, 1H, CH_2S), 2,14–1,97 (m, 4H, CH_2CO , CF_2CH_2), 1,94 (t, $^4J=2,5$ Hz, 1H CH_2CCH), 1,67–1,49 (4H, CH_2CH_2CO , $CF_2CH_2CH_2$ masqué par le signal de H_2O), 1,39–1,20 (m, 12H, $CF_2(CH_2)_2(CH_2)_6$)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 500 MHz) : δ (ppm) 173,43, 169,86, 169,01, 144,49, 144,23, 129,65, 129,53, 128,41, 128,26, 127,21, 127,13, 79,20, 71,44, 67,46, 67,30, 52,22, 52,08, 36,53, 33,86, 33,14, 30,45, 29,85, 29,52, 29,50, 29,43, 29,36, 29,24, 29,02, 25,60, 20,21

RMN ^{19}F ($CDCl_3$, 200 MHz) : δ (ppm) -81,1 (3F, CF_3), -114,7 (2F, CF_2CH_2), -124,5 (2F, $CF_3CF_2CF_2$), -126,1 (2F, CF_3CF_2)

ESI-MS (mode positif) : $m/z=1154,6$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[M+Na]^+$, avec $M=C_{62}H_{62}F_9N_3O_3S_2$ (1131,41).

*B. Synthèse du 2,2-diméthyl-3-(12,12,13,13,14,14,15,15,15-nonafluoropentadécanoyl)-N-(prop-2-ynyl)thiazolidine-4-carboxamide, F₄C₁₀-CystDmt-CH₂CCH **29***



De la même façon que pour la préparation de **22**, F₄C₁₀-CystDmt-OH **26** (1 eq, 0,091 mmol, 50 mg), la DIPEA (2 eq, 0,183 mmol, 32 μ L), HOBT (1,5 eq, 0,137 mmol, 18,5 mg) et DIC (1,2 eq, 0,110 mmol, 17 μ L) sont mis à réagir avec la propargylamine (2 eq, 0,183 mmol, 11,7 μ L) pour conduire au composé **29** sous la forme d'un solide blanc (53 mg, 74%).

FB : C₂₄H₃₃F₉N₂O₂S

PM : 584,58 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 99:1, v/v) : 0,46

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 6,36 (t, ³J=5,8 Hz, 1H, NHCH₂), 4,70 (d, ³J=6,2 Hz, 1H, NCHCO), 4,17 (ddd, ²J=17,5 Hz, ³J=5,6 Hz, ⁴J=2,4 Hz, 1H, CH₂CCH), 4,01 (ddd, ²J=17,5 Hz, ³J=5,1 Hz, ⁴J=2,6 Hz, 1H, CH₂CCH), 3,46–3,11 (m, 2H, CH₂S), 2,38–1,88 (m, 5H, CH₂CCH, CF₂CH₂, CH₂CO), 1,98 et 1,82 (2s, 6H, 2xCH₃), 1,73–1,47 (m, 4H, CH₂CH₂CO, CF₂CH₂CH₂), 1,47–1,13 (m, 12H, CF₂(CH₂)₂(CH₂)₆)

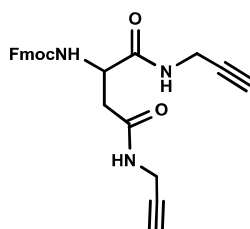
RMN ¹³C (CDCl₃, 500 MHz) : δ (ppm) 172,12, 170,62, 78,66, 74,17, 72,37, 67,34, 37,10, 32,16, 30,90, 29,76, 29,54, 29,47, 29,45, 29,33, 29,29, 29,21, 28,54, 28,44, 24,94, 20,19

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) -81,1 (3F, CF₃), -114,7 (2F, CF₂CH₂), -124,6 (2F, CF₃CF₂CF₂), -126,1 (2F, CF₃CF₂)

ESI-MS (mode positif) : m/z=585,3 et 607,3, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+H]⁺ et [M+Na]⁺, avec M=C₂₄H₃₃F₉N₂O₂S (584,21).

*C. Synthèse du 2-(2,2-diméthyl-3-(12,12,13,13,14,14,15,15,15-nonafluoropentadécanoyl)thiazolidine-4-carboxamido)-N¹,N⁴-di(prop-2-ynyl)succinamide, F₄C₁₀-CystDmt-Asp(CH₂CCH)₂ **27***

*Synthèse du (9H-fluoren-9-yl)méthyl 1,4-dioxo-1,4-bis(prop-2-ynylamino)butan-2-ylcarbamate, Fmoc-Asp(CH₂CCH)₂ **42***



A une solution de Fmoc-Asp-OH (1 eq, 0,28 mmol, 100 mg) dans le DMF (2 mL) sont successivement ajoutés la DIPEA (4 eq, 1,13 mmol, 197 μ L) et HBTU (4 eq, 1,13 mmol, 427 mg), l'ensemble étant agité pendant 3 min pour pré-activer la fonction acide carboxylique. La propargylamine (3 eq, 0,84

mmol, 54 μ L) est ensuite ajoutée et le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2 h 30, jusqu'à consommation totale du produit de départ (suivi CCM). Après évaporation du DMF sous pression réduite, le brut est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution aqueuse saturée de Na_2CO_3 . La phase aqueuse est ensuite extraite à l'acétate d'éthyle (2 fois) et les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl puis séchées sur MgSO_4 . Après filtration et concentration sous vide, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v) pour conduire au composé **42** sous la forme d'un solide blanc (96 mg, 80%).

FB : $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$

PM : 429,48 g.mol^{-1}

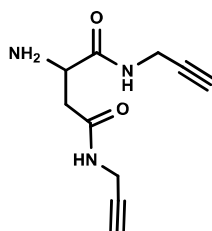
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v) : 0,40

RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) 7,80 (d, $^3J=7,4$ Hz, 2H, *H*-Fmoc), 7,66 (d, $^3J=7,0$ Hz, 2H, *H*-Fmoc), 7,46–7,26 (m, 4H, *H*-Fmoc), 4,51 (dd, $^3J=7,7$ Hz, $^3J=5,8$ Hz, 1H, NHCHCO), 4,44–4,16 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, CH-Fmoc), 4,07–3,87 (m, 4H, CH_2CCH), 2,80–2,47 (m, 4H, CH_2CONH , CH_2CCH)

RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) 170,56, 168,56, 155,37, 143,47, 140,36, 127,32, 126,77, 125,00, 119,76, 80,72, 80,66, 72,78, 72,59, 65,43, 51,04, 46,27, 36,88, 27,83, 27,61

ESI-MS (mode positif) : $m/z=429,1$ et $452,9$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ (429,17).

Synthèse du 2-amino- N^1, N^4 -di(prop-2-ynyl)succinamide, $\text{H}_2\text{N-Asp}(\text{CH}_2\text{CCH})_2$ **43**



Le composé **42** (100 mg, 0,23 mmol) est dissout dans une solution de pipéridine à 20% dans le DMF (5 mL), puis le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante. Le milieu est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2, v/v) pour conduire au composé **43** sous la forme d'un solide blanc (48 mg, 83%).

FB : $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$

PM : 207,23 g.mol^{-1}

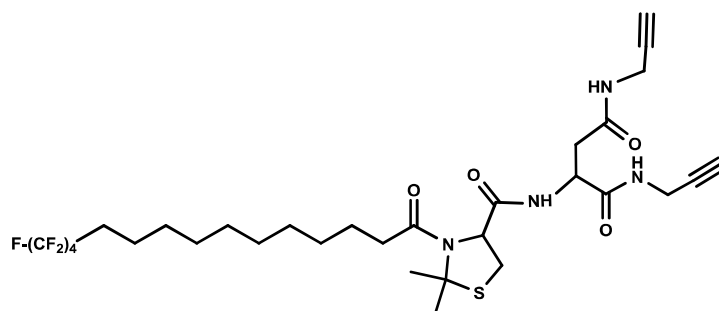
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2, v/v) : 0,50

RMN ^1H (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) 4,02–3,92 (m, 4H, CH_2CCH), 3,67 (dd, $^3J=8,1$ Hz, $^3J=5,2$ Hz, 1H, NH_2CHCO), 2,70–2,52 (m, 3H, CH_2CONH , CH_2CCH), 2,43 (dd, $^2J=15,0$ Hz, $^3J=8,4$ Hz, 1H, CH_2CONH)

RMN ^{13}C (MeOD, 200 MHz) : δ (ppm) 176,15, 172,75, 80,65, 80,58, 72,46, 72,41, 53,47, 41,61, 29,66, 29,58

ESI-MS (mode positif) : $m/z=208,2$ et $230,3$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ (207,1).

Synthèse du 2-(2,2-diméthyl-3-(12,12,13,13,14,14,15,15,15-nonafluoropentadécanoyl)thiazolidine-4-carboxamido)- N^1,N^4 -di(prop-2-ynyl)succinamide, F_4C_{10} -CystDmt-Asp(CH_2CCH) $_2$ **27**



A une solution de F_4C_{10} -CystDmt-OH **26** (1 eq, 0,084 mmol, 46 mg) dans le DMF (1 mL) sont successivement ajoutés la DIPEA (2 eq, 0,168 mmol, 29,3 μL), HOBt (1,5 eq, 0,126 mmol, 17 mg) et DIC (1,2 eq, 0,101 mmol, 15,6 μL). Après activation de la fonction acide carboxylique pendant 30 min, le bis-alcyne **43** (2 eq, 0,126 mmol, 26 mg) est ajoutée et le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le suivi CCM indique alors une consommation totale du produit de départ. Après évaporation du DMF sous pression réduite, le brut est repris dans l'acétate d'éthyle et lavé avec une solution de HCl 0,01N (pH=2) (2 fois). La phase aqueuse est ensuite extraite à l'acétate d'éthyle (2 fois) et les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2 fois), séchées sur MgSO_4 et filtrées. Après concentration sous vide, le résidu est finalement purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v) pour conduire au composé bis-alcyne **27** sous la forme d'un solide blanc (51 mg, 82%).

FB : $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{F}_9\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$

PM : 736,74 g.mol^{-1}

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v) : 0,30

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, 322,8K) : δ (ppm) 7,88 (d, $^3J=7,5$ Hz, 1H, NHCHCO), 7,33 (br s, 1H, NHCH_2CCH), 5,96 (br s, 1H, NHCH_2CCH), 5,08-4,66 (m, 2H, N(H)CHCO), 4,17-3,83 (m, 4H, CH_2CCH), 3,36 (dd, $^2J=12,5$ Hz, $^3J=7,0$ Hz, 1H, CH_2S), 3,20 (dd, $^2J=12,5$ Hz, $^3J=1,5$ Hz, 1H, CH_2S), 2,92 (br s, 1H, CH_2CCH), 2,51 (m, 2H, CH_2CONH), 2,37-1,92 (m, 5H, CH_2CCH , CF_2CH_2 , CH_2CO), 2,03 et 1,87 (2s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1,76-1,54 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,43-1,15 (m, 12H, $\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$)

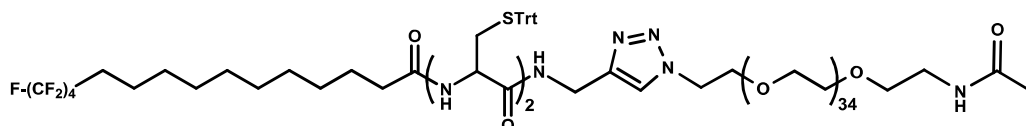
RMN ^{19}F (CDCl_3 , 200 MHz) : δ (ppm) -81,1 (3F, CF_3), -114,7 (2F, CF_2CH_2), -124,5 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -126,1 (2F, CF_3CF_2)

ESI-MS (mode positif) : $m/z=737,1$, 748,3 et 759,3, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[(2\text{M}+\text{H}+\text{Na})/2]^{2+}$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{F}_9\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ (736,27).

I.4.2.3 MONO- ET DOUBLE-CLICK

A. Synthèse du F_4C_{10} -Cyst₂-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **24b(c₂)**

Synthèse du F_4C_{10} -[Cyst(Trt)]₂-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **23b**



Le conjugué pegylé **23b** a été obtenu à partir de F_4C_{10} -[Cyst(Trt)]₂-CH₂CCH **22** (1 eq, 8,8 µmol, 10 mg) et N₃-PEG_{1.6K}-Ac **14b** (1,2 eq, 10,7 µmol, 17,7 mg) suivant le protocole 2-méthode A (cf. **paragraphe I.2.2**), avec 15 eq de DIPEA. On obtient le composé **23b** sous la forme d'un solide blanc (18 mg, 72%).

FB : C₁₃₆H₂₁₀F₉N₇O₃₉S₂

PM : 2802,29 g.mol⁻¹

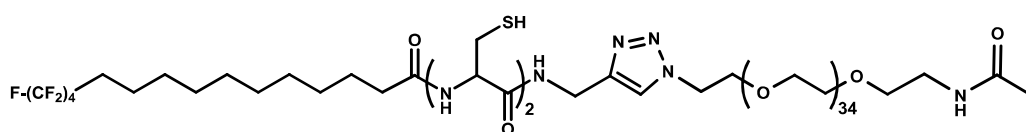
Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,36

RMN ¹H (DMSO-*d*⁶, 200 MHz) : δ (ppm) 8,40–7,83 (m, 4H, NHCH₂CCH, NHCHCO, NHCOCH₃), 7,77, (s, 1H, NHCH₂CCH), 7,54–7,10 (m, 30H, *H*-Trt), 4,57–4,14 (m, 4H, NHCHCO, NHCH₂CCH), 4,05–3,10 (m, 144H, CH₂CH₂O), 2,44–1,96 (m, 8H, CH₂CO, CF₂CH₂, CH₂S), 1,79 (s, 3H, CH₃), 1,60–1,38 (m, 4H, CH₂CH₂C(O), CF₂CH₂CH₂), 1,38–1,07 (m, 12H, CF₂(CH₂)₂(CH₂)₆)

RMN ¹⁹F (DMSO-*d*⁶, 200 MHz) : δ (ppm) -80,6 (3F, CF₃), -113,7 (2F, CF₂CH₂), -124,0 (2F, CF₃CF₂CF₂), -125,8 (2F, CF₃CF₂)

ESI-HRMS (mode positif) : *m/z*=956,4546, en accord avec la masse exacte calculée pour [(M+Na+HCOOH)/3]³⁺, avec M=C₁₃₆H₂₁₀F₉N₇O₃₉S₂ (2800,3960).

Synthèse du F_4C_{10} -Cyst₂-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **24b(c₂)**



Le composé **23b** (10 mg, 3,6 µmol) est agité pendant une nuit en milieu TFA/TIS 95:5 (v/v), i.e. jusqu'à disparition totale sur CCM. Après concentration sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 en utilisant des solvants dégazés (CH₂Cl₂/MeOH 2:8 (v/v) + 0,1% TFA) pour conduire à F_4C_{10} -Cyst₂-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **24b(c₂)** sous la forme d'un solide blanc (7 mg, 75%).

FB : C₉₈H₁₈₂F₉N₇O₃₉S₂

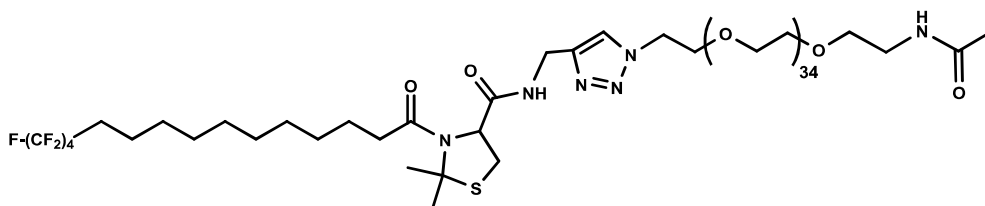
PM : 2317,65 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,29

ESI-HRMS (mode positif) : *m/z*=1180,0962, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+2H+42]/2]²⁺, avec M=C₉₈H₁₈₂F₉N₇O₃₉S₂ (2316,1768).

B. Synthèse du F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **24b(c₁)**

Synthèse du F_4C_{10} -CystDmt-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **30b**



Le conjugué pegylé **30b** a été obtenu à partir de F_4C_{10} -CystDmt-CH₂CCH **29** (1 eq, 7,5 μ mol, 4,4 mg) et N₃-PEG_{1.6K}-Ac **14b** (1,2 eq, 9,0 μ mol, 15 mg) suivant le protocole 2-méthode A (cf. **paragraphe I.2.2**) modifié. Après la chromatographie d'exclusion stérique, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice (toluène/MeOH 8:2, v/v). On obtient le composé **30b** sous la forme d'un solide blanc (11 mg, 65%).

FB : C₉₈H₁₈₁F₉N₆O₃₈S

PM : 2254,55 g.mol⁻¹

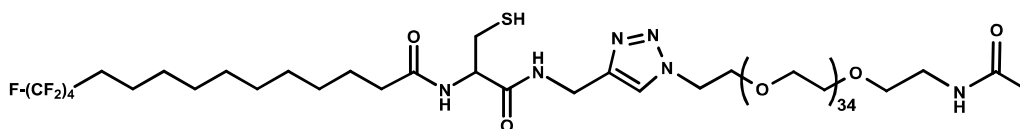
Rf (toluène/MeOH 1:1, v/v) : 0,56

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) 7,72 (s, 1H, NHCH₂CCH), 7,03–6,59 (m, 2H, NHCOCH₃, NHCH₂CCH), 4,78–4,40 (m, 3H, NCHCO, NHCH₂CCH), 4,05–3,13 (m, 144H, CH₂CH₂O), 2,35–1,70 (m, 6H, CH₂CO, CF₂CH₂, CH₂S), 1,94 et 1,81 (2s, 6H, (CH₃)₂CS), 1,98 (s, 3H, CH₃CO), 1,69–1,45 (m, 4H, CH₂CH₂CO, CF₂CH₂CH₂), 1,45–1,10 (m, 12H, CF₂(CH₂)₂(CH₂)₆)

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 200 MHz) : δ (ppm) -81,1 (3F, CF₃), -114,6 (2F, CF₂CH₂), -124,3 (2F, CF₃CF₂CF₂), -125,8 (2F, CF₃CF₂)

ESI-HRMS (mode positif) : m/z=2254,2, 2276,2 et 1127,6, en accord avec la masse exacte calculée pour [M+H]⁺, [M+Na]⁺ et [(M+2H)/2]²⁺, respectivement avec M=C₉₈H₁₈₁F₉N₆O₃₈S (2253,20).

Synthèse du F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **24b(c₁)**



De la même façon que pour la préparation de **24b(c₂)**, la fonction thiol du composé **30b** est déprotégée en milieu acide pour conduire au conjugué F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **24b(c₁)** sous la forme d'un solide blanc (77 %).

FB : C₉₅H₁₇₇F₉N₆O₃₈S

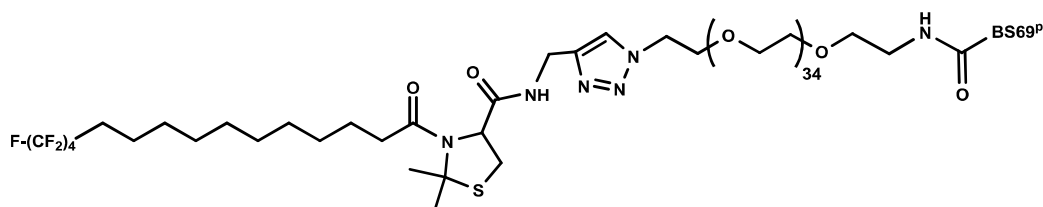
PM : 2214,49 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,59

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1139,6074$ et $1150,5964$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(M+2H+42)/2]^{2+}$ et $[(M+H+Na+42)/2]^{2+}$, avec $M=C_{95}H_{177}F_9N_6O_{38}S$ (2213,1680).

C. Synthèse du F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1.6K}-BS69) **24a(c₁)** (chlorure)

Synthesis du F_4C_{10} -CystDmt-mono-(PEG_{1.6K}-BS69^p) **30a**



Le conjugué pegylé **30a** a été obtenu à partir de F_4C_{10} -CystDmt-CH₂CCH **29** (1 eq, 3,9 μ mol, 2,3 mg) et N₃-PEG_{1.6K}-BS69^p **14a** (1,2 eq, 4,6 μ mol, 20 mg) suivant le protocole 2-méthode A (cf. **paragraphe I.2.2**) modifié. Après une nuit au reflux du THF, 1 eq de CuI est rajouté et le milieu est laissé sous agitation à 70°C pendant encore 24 h. Deux purifications successives sur CCM préparative sont nécessaires. On obtient le composé **30a** sous la forme d'un solide jaune (14 mg, 74%).

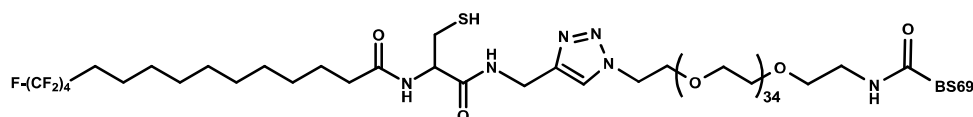
FB : C₂₃₈H₃₇₆F₉N₂₇O₆₁S₄

PM : 4890,98 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,45

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=929,9034$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[M+5H]^{5+}$, avec $M=C_{219}H_{362}F_9N_{27}O_{61}S_4$ (4645,48) ; la molécule ayant perdue un groupement protecteur trityle.

Synthèse du F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1.6K}-BS69) **24a(c₁)** (chlorure)



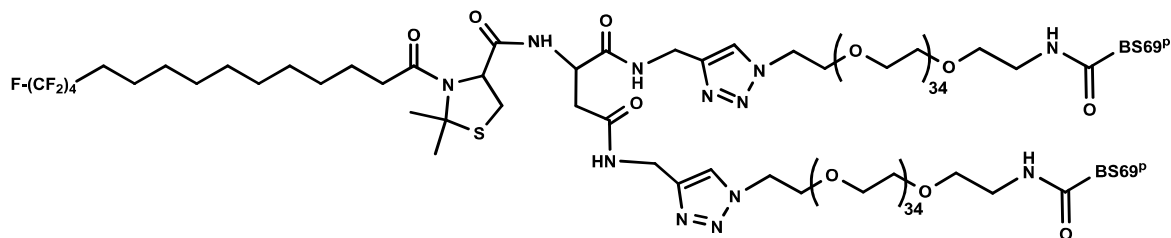
Le composé **30a** (10 mg, 2,0 μ mol) est agité pendant une nuit en milieu TFA/TIS 95:5 (v/v). Après concentration sous pression réduite et co-évaporation avec du cyclohexane, le résidu est purifié par dialyse en milieu dégazé (membrane RC, MWCO 1kDa, MeOH/H₂O 95:5 (v/v) + 1% d'acide formique). Le produit est finalement repris dans HCl 1N et lyophilisé pour conduire au conjugué F_4C_{10} -Cyst-mono-(PEG_{1.6K}-BS69) **24a(c₁)** (chlorure) sous la forme d'un solide jaune (6 mg, 78%).

FB : C₁₅₅H₂₈₃Cl₃F₉N₂₇O₅₅S₂

PM : 3746,56 g.mol⁻¹

D. Synthesis du F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69) **21(c₁)**

Synthèse du F_4C_{10} -CystDmt-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69^p)₂ **28**



Le conjugué pegylé **28** a été obtenu à partir de F_4C_{10} -CystDmt-Asp(CH₂CCH)₂ **27** (1 eq, 2,2 μmol, 1,6 mg) et N₃-PEG_{1.6K}-BS69^p **14a** (2,1 eq, 4,6 μmol, 20 mg) suivant le protocole 2-méthode B (cf. **paragraphe I.2.2**). On obtient le composé **28** sous la forme d'un solide jaune (16 mg, 77%).

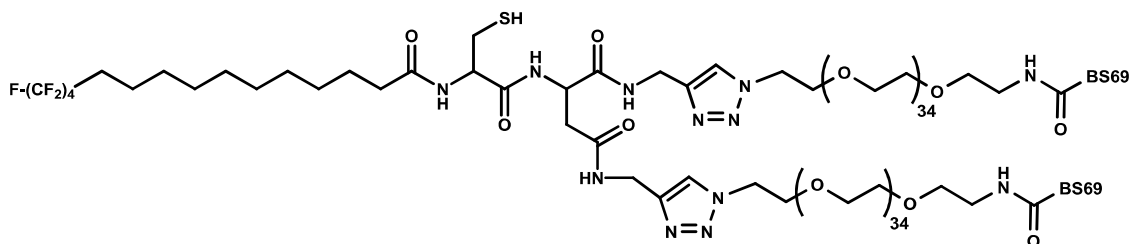
FB : C₄₅₉H₇₂₇F₉N₅₄O₁₂₂S₇

PM : 9349,53 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,47

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1869,6007$, en accord avec la masse exacte calculée pour [(M+5H)/5]⁵⁺, avec M=C₄₅₉H₇₂₇F₉N₅₄O₁₂₂S₇ (9343,0244).

Synthèse du F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69)₂ **21(c₁)** (chlorure)



De la même façon que pour la préparation de **24a(c₁)**, le composé **28** est totalement déprotégé en milieu acide pour conduire au conjugué F_4C_{10} -Cyst-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69)₂ **21(c₁)** (chlorure) sous la forme d'un solide jaune (85 %).

FB : C₂₉₆H₅₄₅Cl₆F₉N₅₄O₁₁₀S₃

PM : 7100,75 g.mol⁻¹

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=989,5490$, en accord avec la masse exacte calculée pour [(M+7H+42)/7]⁷⁺, avec M=C₂₉₆H₅₃₉F₉N₅₄O₁₁₀S₃ (6877,7256).

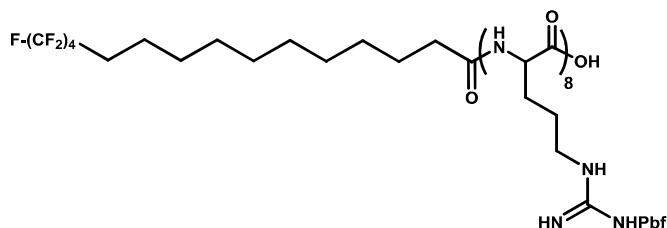
Avant chaque utilisation des dérivés cystéine, nous nous sommes assurés d'une réduction maximale des fonctions thiol en passant ces produits sur une résine tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP)⁸ immobilisée sur support agarose (Thermo Scientific™ Pierce™). Le TCEP est un agent reconnu pour sa grande efficacité à réduire les ponts disulfure même en conditions acides.⁹ A notre grande surprise,

tous les spectres HRMS issus de ce protocole ont présenté un adduit +42 correspondant à l'azoture du NaN_3 utilisé comme agent anti-prolifération.

I.5 PREPARATION DES DERIVES OCTAARGININE (PARTIE II, CHAPITRE IV)

I.5.1 SYNTHÈSE DE L'AMPHIPHILE CATIONIQUE $\text{F}_4\text{C}_{10}\text{-ARG}_8\text{-CH}_2\text{CCH}$ **36**

Synthèse du $\text{F}_4\text{C}_{10}\text{-[Arg(Pbf)]}_8\text{-OH}$ **34**



Le composé **34** a été obtenu suivant le protocole 1 (cf. **paragraphe I.2.1**) : étape 2 : Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2 eq, 1,56 mmol, 1,012 g) ; étape 3 : $n = 7$ cycles, étape 4 : $\text{F-(CF}_2)_4(\text{CH}_2)_{10}\text{-COOH}$ (2 eq, 1,56 mmol, 631 mg) ; clivage final suivant l'étape 5. On obtient le composé **34** sous la forme d'un solide blanc (2,46 g, 86%).

FB : $\text{C}_{167}\text{H}_{245}\text{F}_9\text{N}_{32}\text{O}_{34}\text{S}_8$

PM : $3672,45 \text{ g.mol}^{-1}$

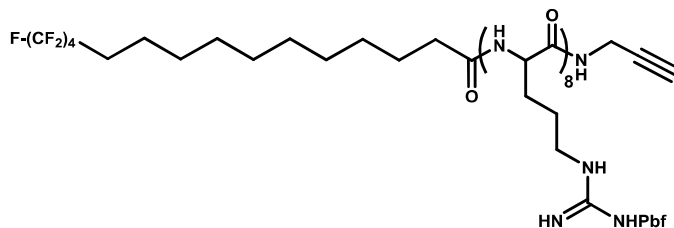
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,51

RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz) : δ (ppm) 8,51–7,79 (br s, 8H, NHCHCO), 7,39–6,02 (m, 24H, NHC(NH)NH), 4,55–3,93 (m, 8H, NHCHCO), 3,02 (br s, 16H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2,94 (s, 16H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2,47 et 2,41 (2s, 48H, CH_3CCS), 2,24–1,87 (m, 28H, CH_3CCO , CF_2CH_2 , CH_2CO), 1,81–1,27 (m, 84H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,20 (br s, 12H, $\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$)

RMN ^{19}F ($\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz) : δ (ppm) -80,6 (3F, CF_3), -113,6 (2F, CF_2CH_2), -124,0 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -125,8 (2F, CF_3CF_2)

ESI-MS (mode positif) : $m/z=1835,5$, $1846,5$ et $1858,1$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(M+2\text{H})/2]^{2+}$, $[(M+\text{H}+\text{Na})/2]^{2+}$ et $[(M+2\text{Na})/2]^{2+}$, respectivement avec $M=\text{C}_{167}\text{H}_{245}\text{F}_9\text{N}_{32}\text{O}_{34}\text{S}_8$ (3669,60).

Synthèse du $\text{F}_4\text{C}_{10}\text{-[Arg(Pbf)]}_8\text{-CH}_2\text{CCH}$ **35**



A une solution du composé **34** (1 eq, 0,054 mmol, 200 mg) dans le DMF (3 mL) sont successivement ajoutés la DIPEA (3 eq, 0,109 mmol, 19,0 μL) et HBTU (2 eq, 0,109 mmol, 41,3 mg). La fonction acide

carboxylique est pré-activée pendant 3 min puis la propargylamine (1,5 eq, 0,082 mmol, 5,3 μ L) est ajoutée. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h ; le produit de départ est alors totalement consommé (suivi CCM). Après évaporation du DMF sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5, v/v) pour conduire au composé **35** sous la forme d'un solide blanc (159 mg, 79%).

FB : $\text{C}_{170}\text{H}_{248}\text{F}_9\text{N}_{33}\text{O}_{33}\text{S}_8$

PM : 3709,52 g.mol^{-1}

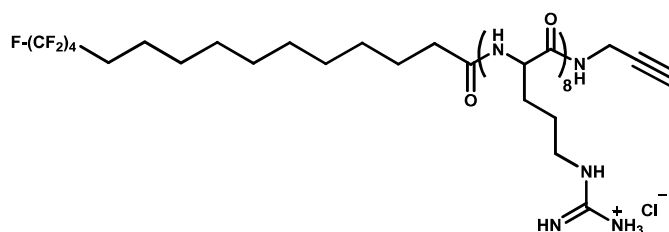
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,70

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$, 500 MHz) : δ (ppm) 8,41–7,79 (m, 9H, NHCH_2CCH , NHCHCO), 7,35–6,13 (m, 24H, NHC(NH)NH), 4,33–4,15 (m, 8H, NHCHCO), 3,84 (br s, 2H, NHCH_2CCH), 3,06 (t, $^4J=2,5$ Hz, 1H, NHCH_2CCH), 3,02 (br s, 16H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2,93 (s, 16H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2,47 et 2,41 (2s, 48H, CH_3CCS), 2,26–2,04 (m, 4H, CF_2CH_2 , CH_2CO), 1,99 (s, 24H, CH_3CCO), 1,73–1,56 (br s, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1,56–1,29 (m, 76H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,29–1,15 (m, 12H, $\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$)

RMN ^{19}F ($\text{DMSO}-d^6$, 200 MHz) : δ (ppm) -80,5 (3F, CF_3), -113,6 (2F, CF_2CH_2), -124,0 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -125,8 (2F, CF_3CF_2)

ESI-MS (mode positif) : $m/z=1876,4$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(M+2\text{Na})/2]^{2+}$, avec $M=\text{C}_{170}\text{H}_{248}\text{F}_9\text{N}_{33}\text{O}_{33}\text{S}_8$ (3706,64).

Synthèse du $\text{F}_4\text{C}_{10}\text{-Arg}_8\text{-CH}_2\text{CCH}$ **36** (chlorure)



Les chaînes latérales des arginines du composé **35** (55 mg, 0,015 mmol) sont déprotégées au moyen d'une solution TFA/TIS 95:5 (2 mL), le milieu étant placé sous agitation à température ambiante pendant au minimum 4 h (suivi CCM). Le produit est ensuite précipité dans Et_2O froid et centrifugé. Après élimination du surnageant, le solide est repris dans une solution de HCl 1N puis lyophilisé pour conduire au composé $\text{F}_4\text{C}_{10}\text{-Arg}_8\text{-CH}_2\text{CCH}$ **36** (chlorure) sous la forme d'un solide jaune (28 mg, 76%).

FB : $\text{C}_{66}\text{H}_{128}\text{Cl}_8\text{F}_9\text{N}_{33}\text{O}_9$

PM : 1982,56 g.mol^{-1}

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d^6$, 500 MHz) : δ (ppm) 8,51–6,33 (m, 49H, NHCH_2CCH , NHCHCO , NHC(NH)NH_3^+), 4,34–4,09 (m, 8H, NHCHCO), 3,86 (br s, 2H, NHCH_2CCH), 3,18–3,01 (m, 17H, NHCH_2CCH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2,27–2,04 (m, 4H, CF_2CH_2 , CH_2CO), 1,80–1,32 (m, 36H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,30–1,15 (m, 12H, $\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$)

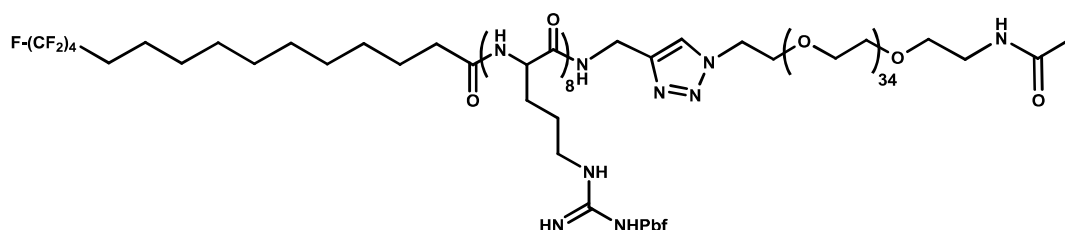
RMN ^{19}F (DMSO- d^6 , 200 MHz) : δ (ppm) -80,5 (3F, CF_3), -113,6 (2F, CF_2CH_2), -124,0 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -125,8 (2F, CF_3CF_2)

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1690,9822$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$, avec $\text{M}=\text{C}_{66}\text{H}_{120}\text{F}_9\text{N}_{33}\text{O}_9$ (1689,9801).

I.5.2 SYNTHÈSE DES CONJUGUES PEGYLES

A. Synthèse du F_4C_{10} -Arg $_8$ -mono-(PEG $_{1.6\text{K}}$ -Ac) **38b** (chlorure)

Synthèse du F_4C_{10} -[Arg(Pbf)] $_8$ -mono-(PEG $_{1.6\text{K}}$ -Ac) **37b**



Le conjugué pegylé **37b** a été obtenu à partir de F_4C_{10} -[Arg(Pbf)] $_8$ -CH $_2$ CCH **35** (1 eq, 0,011 mmol, 40 mg) et N_3 -PEG $_{1.6\text{K}}$ -Ac **14b** (1,2 eq, 0,013 mmol, 21,6 mg) suivant le protocole 2-méthode A (cf. **paragraphe I.2.2**). On obtient le composé **37b** sous la forme d'un solide blanc (41 mg, 71%).

FB : $\text{C}_{244}\text{H}_{396}\text{F}_9\text{N}_{37}\text{O}_{69}\text{S}_8$

PM : 5379,51 g.mol $^{-1}$

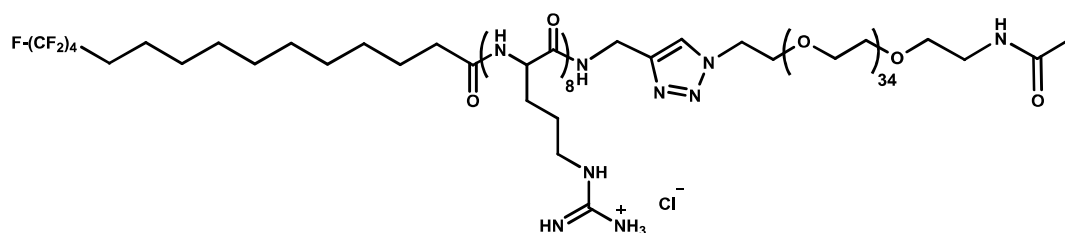
Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v): 0,42

RMN ^1H (DMSO- d^6 , 500 MHz) : δ (ppm) 8,42–7,78 (m, 11H, NHCH_2CCH , NHCHCO , NHCOCH_3), 7,45–6,10 (m, 24H, $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}$), 4,46 (m, 1H, NHCH_2CCH), 4,39–4,05 (m, 8H, NHCHCO), 4,03–3,13 (m, 144H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3,77 (m, 1H, NHCH_2CCH), 3,01 (br s, 16H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2,93 (s, 16H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2,46 et 2,41 (2s, 48H, CH_3CCS), 2,26–2,04 (m, 4H, CF_2CH_2 , CH_2CO), 1,99 (s, 24H, CH_3CCO), 1,79 (s, 3H, CH_3CO), 1,72–1,55 (br s, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1,55–1,28 (m, 76H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,28–1,14 (m, 12H, $\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$)

RMN ^{19}F (DMSO- d^6 , 200 MHz) : δ (ppm) -80,5 (3F, CF_3), -113,6 (2F, CF_2CH_2), -124,0 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -125,8 (2F, CF_3CF_2)

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1344,9125$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(\text{M}+4\text{H})/4]^{4+}$, avec $\text{M}=\text{C}_{244}\text{H}_{396}\text{F}_9\text{N}_{37}\text{O}_{69}\text{S}_8$ (5375,6230).

Synthèse du F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **38b** (chlorure)



Le composé **37b** (30 mg, 5,6 μ mol) est agité pendant 4 h à température ambiante en milieu TFA/TIS 95:5 (v/v), i.e. jusqu'à disparition totale sur CCM. Après concentration sous pression réduite, le résidu est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur résine Sephadex LH-60 (CH₂Cl₂/MeOH 2:8, v/v). Le produit est finalement repris dans une solution de HCl 1N puis lyophilisé pour conduire à F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1.6K}-Ac) **38b** (chlorure) sous la forme d'un solide blanc (14 mg, 70%).

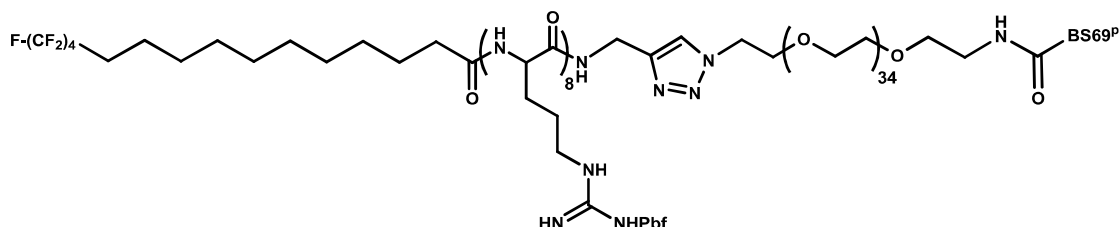
FB : C₁₄₀H₂₇₆ClF₉N₃₇O₄₅

PM : 3652,55 g.mol⁻¹

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1120,6693$, en accord avec la masse exacte calculée pour [(M+3H)/3]³⁺, avec M=C₁₄₀H₂₆₈F₉N₃₇O₄₅ (3358,9673).

B. Synthèse du F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1.6K}-BS69) **38a** (chlorure)

Synthèse du F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-mono-(PEG_{1.6K}-BS69^p) **37a**



Le conjugué pegylé **37a** a été obtenu à partir de F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-CH₂CCH **35** (1 eq, 2,7 μ mol, 10 mg) et N₃-PEG_{1.6K}-BS69^p **14a** (1,2 eq, 3,2 μ mol, 14 mg) suivant le protocole 2-méthode A (cf. **paragraphe I.2.2**) modifié. Après une nuit au reflux du THF, 1 eq de CuI est rajouté et le milieu est laissé sous agitation à 70°C pendant encore 24 h. On obtient le composé **37a** sous la forme d'un solide jaune (13 mg, 59%).

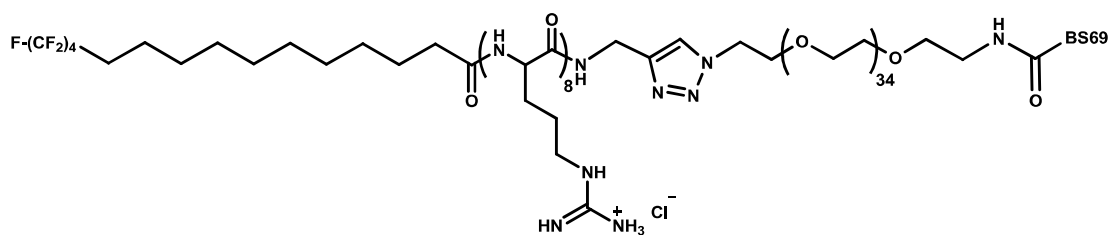
FB : C₃₈₄H₅₉₁F₉N₅₈O₉₂S₁₁

PM : 8015,91 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,52

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1316,9710$, en accord avec la masse exacte calculée pour [(M+H+5Na).H₂O/6]⁶⁺, avec M=C₃₆₅H₅₇₇F₉N₅₈O₉₂S₁₁ (7767,9038) ; la molécule ayant perdue un groupement protecteur trityle.

Synthèse du F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1.6K}-BS69) **38a** (chlorure)



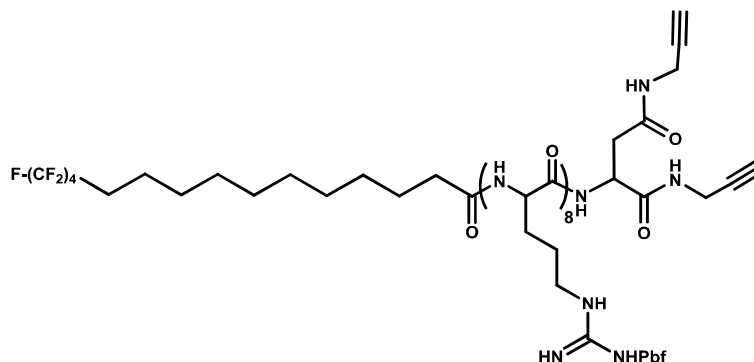
Le composé **37a** (10 mg, 1,2 μ mol) est agité pendant une nuit en milieu TFA/TIS 95:5 (v/v). Après concentration sous pression réduite et co-évaporation avec du cyclohexane, le résidu est purifié par dialyse (membrane RC, MWCO 1kDa, MeOH). Le produit est finalement repris dans HCl 1N et lyophilisé pour conduire au conjugué F_4C_{10} -Arg₈-mono-(PEG_{1.6K}-BS69) **38a** (chlorure) sous la forme d'un solide jaune (4 mg, 67%).

FB : $C_{200}H_{382}Cl_{11}F_9N_{58}O_{62}S$

PM : 5184,60 g.mol⁻¹

C. Synthèse du F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69) **41** (chlorure)

Synthèse du F_4C_{10} -[Arg(Pbf)]₈-Asp(CH₂CCH)₂ **39**



A une solution du composé **34** (1 eq, 0,027 mmol, 100 mg) dans le DMF (2 mL) sont successivement ajoutés la DIPEA (3 eq, 0,081 mmol, 14,1 μ L) et HBTU (2 eq, 0,054 mmol, 20,5 mg). La fonction acide carboxylique est pré-activée pendant 3 min puis le composé bis-alcyne **43** (1,5 eq, 0,041 mmol, 8,4 mg) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 2 h ; le produit de départ est alors totalement consommé (suivi CCM). Après évaporation du DMF sous pression réduite, le brut est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séché sur MgSO₄ et filtré. Après concentration sous vide, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne en gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v) pour conduire au composé **39** sous la forme d'un solide blanc (81 mg, 78%).

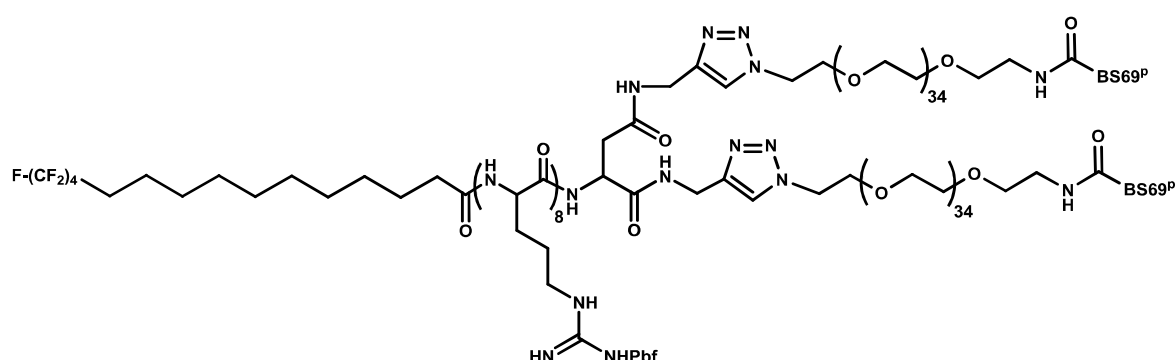
FB : $C_{177}H_{256}F_9N_{35}O_{35}S_8$

PM : 3861,67 g.mol⁻¹

Rf (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v) : 0,51

RMN ^1H (DMSO- d^6 , 500 MHz) : δ (ppm) 8,39–8,29 et 8,29–8,21 (2m, 2H, NHCH_2CCH), 8,21–7,80 (m, 9H, NHCHCO), 7,30–6,11 (m, 24H, $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}$), 4,40–4,06 (m, 9H, NHCHCO), 3,90–3,72 (m, 4H, NHCH_2CCH), 3,13–2,85 (m, 36H, CH_2CCH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$, CH_2CONH), 2,47 et 2,41 (2s, 48H, CH_3CCS), 2,26–2,04 (m, 4H, CF_2CH_2 , CH_2CO), 1,98 (s, 24H, CH_3CCO), 1,73–1,57 (br s, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1,57–1,30 (m, 76H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{OC}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,30–1,14 (m, 12H, $\text{CF}_2(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6$)
 RMN ^{19}F (DMSO- d^6 , 200 MHz) : δ (ppm) -80,5 (3F, CF_3), -113,6 (2F, CF_2CH_2), -124,0 (2F, $\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CF}_2$), -125,8 (2F, CF_3CF_2)
 ESI-MS (mode positif) : $m/z=1930,4$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(\text{M}+2\text{H})/2]^{2+}$, avec $\text{M}=\text{C}_{177}\text{H}_{256}\text{F}_9\text{N}_{35}\text{O}_{35}\text{S}_8$ (3858,70).

Synthèse du $\text{F}_4\text{C}_{10}^-[\text{Arg}(\text{Pbf})]_8\text{-Asp-bis-(PEG}_{1.6\text{K}}\text{-BS69}^{\text{P}})_2$ **40**



Le conjugué pegylé **40** a été obtenu à partir de $\text{F}_4\text{C}_{10}^-[\text{Arg}(\text{Pbf})]_8\text{-Asp}(\text{CH}_2\text{CCH})_2$ **39** (1 eq, 2,1 μmol , 8,2 mg) et $\text{N}_3\text{-PEG}_{1.6\text{K}}\text{-BS69}^{\text{P}}$ **14a** (2,2 eq, 4,6 μmol , 20 mg) suivant le protocole 2-méthode B (cf. **paragraphe I.2.2**). On obtient le composé **40** sous la forme d'un solide jaune (16 mg, 62%).

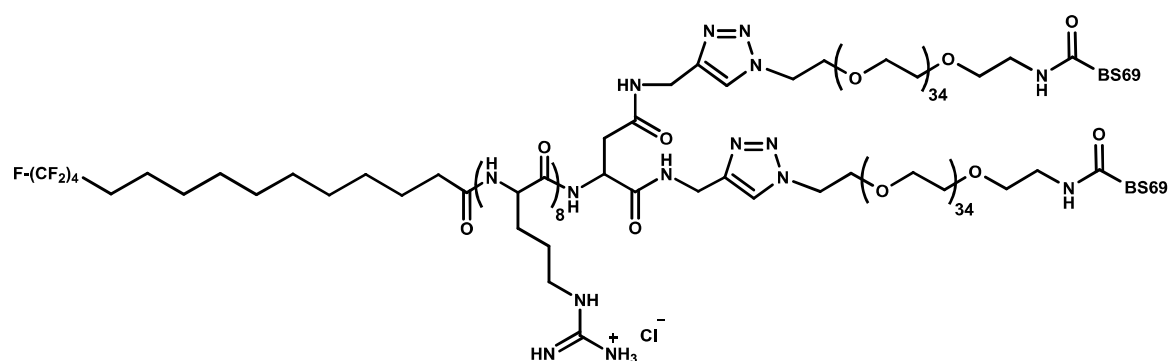
FB : $\text{C}_{605}\text{H}_{942}\text{F}_9\text{N}_{85}\text{O}_{153}\text{S}_{14}$

PM : 12474,46 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, v/v) : 0,47

ESI-HRMS (mode positif) : $m/z=1386,0616$, en accord avec la masse exacte calculée pour $[(\text{M}+9\text{H})/9]^{9+}$, avec $\text{M}=\text{C}_{605}\text{H}_{942}\text{F}_9\text{N}_{85}\text{O}_{153}\text{S}_4$ (12465,4482).

Synthèse du F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69)₂ **41** (chlorure)



De la même façon que pour la préparation de **38a**, le composé **40** est totalement déprotégé en milieu acide pour conduire au conjugué F_4C_{10} -Arg₈-Asp-bis-(PEG_{1.6K}-BS69)₂ **41** (chlorure) sous la forme d'un solide jaune (86 %).

FB : $C_{341}H_{644}Cl_{14}F_9N_{85}O_{117}S_2$

PM : 8538,84 g.mol⁻¹

II. DETERMINATION DE LA CAC DES DETERGENTS

La cac des amphiphiles F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** et F_4C_{10} -Arg₈-CH₂CCH **36** a été déterminée en utilisant une méthode basée sur la fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH).¹⁰ L'expérience consiste à mesurer l'intensité de fluorescence ($I_{ex} = 358$ nm, $I_{em} = 430$ nm) à température constante ($25 \pm 0,5^\circ\text{C}$) d'une gamme de solutions contenant des concentrations croissantes en détergent, 5 μM de DPH et 10 mM de DTT (uniquement pour **13**) dans 150 μL d'HEPES (20 mM, pH 7,4). Les solutions sont incubées pendant 20 min dans le noir avant la mesure. Le graphe donnant l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en amphiphile présente une rupture de pente, la cac est alors la concentration au point d'inflexion.

III. ETUDE DE LA STABILITE DES DERIVES CYSTEINE EN MILIEU HCL – TEST QUANTITATIF D'ELLMAN

Le réactif d'Ellman, l'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB, permet de doser de façon quantitative des groupements sulfhydryles libres en solution. En effet, il réagit spécifiquement avec les thiols en libérant du 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB), produit coloré possédant un coefficient d'extinction molaire de 14,15 mM⁻¹.cm⁻¹ à 412 nm.¹¹ Une solution de réactif d'Ellman est tout d'abord obtenue en dissolvant 4 mg de réactif d'Ellman dans 1 mL de tampon phosphate (0,1M phosphate de potassium, pH 8,0, contenant 1mM d'EDTA). 250 μL de l'échantillon à tester (F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺ **13** à 60 μM dans HCl 1 mM) sont ensuite ajoutés à un mélange contenant 50 μL de la solution de réactif d'Ellman et 2,5 mL de tampon phosphate. Après agitation, l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance de l'échantillon est mesurée à 412 nm

(Varian), puis la concentration en groupements sulfhydryles est déterminée grâce au coefficient d'extinction molaire du NTB.

IV. PREPARATION DES COMPLEXES D'ADN

Les complexes ont été formulés à partir du plasmide pTG11236 (pCMV-SV40-luciférase-SV40pA, 5739 paires de bases) dont les caractéristiques ont été données dans la **partie II** (cf. **chapitre I, paragraphe III.1**). La solution de plasmide utilisée (1 µg/µL dans l'eau) a été obtenue par culture d'*Escherichia Coli* sous pression de kanamycine, puis extraction par lyse alcaline et enfin purification sur colonne échangeuse d'anions (*Qiagen Giga kit endotoxin free*). Les quantités d'agent de compaction à introduire dans les formulations ont été calculées en fonction de la concentration en ADN plasmidique désirée (de 15 à 600 µM suivant les études), du rapport molaire N/P souhaité (avec N la quantité d'amines de l'agent cationique et P la quantité d'équivalents phosphate de l'ADN), de la masse moléculaire ainsi que du nombre de fonctions protonables du vecteur de transfert de gènes. Différents protocoles ont été appliqués suivant l'agent cationique utilisé pour condenser l'ADN :

- *Lip-C₆-NH₃⁺ 3a* (ou *Oct-C₆-NH₃⁺ 3b*) : L'ADN est dilué dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4) à une concentration finale de 600 µM pour les études UV, 200 µM pour les gels d'électrophorèse et 60 µM pour les expériences de DLS/zétamétrie, fluorescence, et sur cellules *in vitro*, et la quantité désirée de dérivé lipoyl (ou octanoyl) est ajoutée à partir de solutions stock à 10 ou 20 mM dans l'éthanol. La suspension est agitée à température ambiante pendant 1 h puis chauffée à 50°C sur la nuit. Les complexes décorés sont obtenus par addition de 5 ou 10 mol% (vs détergent) des conjugués pegylés (solutions stock dans l'HEPES) dans les formulations. Chaque suspension est à nouveau agitée à 50°C pendant 2 h avant utilisation.¹²
- *F₄C₁₀-Cyst-TEO-NH₃⁺ 13* : Toutes les solutions (ADN plasmidique, HEPES, HCl (aq)) sont dégazées par bullage d'argon avant utilisation. L'ADN est dilué dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4) à une concentration finale de 200 µM pour les gels d'électrophorèse, 60 µM pour les expériences sur cellules *in vitro* et 15 µM pour les études de DLS/zétamétrie et de fluorescence, et la quantité désirée de dérivé cystéine est additionnée à partir de solutions stock à 300 ou 3000 µM en milieu HCl à 1 mM. Les complexes ADN/[détergent]₂ sont ensuite formés par agitation des suspensions à température ambiante pendant 12 h. Les complexes décorés sont obtenus par addition de 1, 2, 5 ou 10 mol% (vs détergent) des conjugués pegylés (solutions stock dans HCl 1 mM) successivement après l'agent de compaction.
- *F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH 36* : L'ADN est dilué dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4) à une concentration finale de 200 µM pour les gels d'électrophorèse, 60 µM pour les expériences sur cellules *in vitro* et 15 µM pour les études de DLS/zétamétrie et de fluorescence, et la quantité désirée de dérivé octaarginine est additionnée à partir de solutions stock à 10, 500 ou 1000 µM dans l'HEPES. La suspension est ensuite agitée à température ambiante pendant 30 min avant utilisation. Les complexes décorés sont obtenus par addition de 2, 5 ou 10 mol% (vs

détergent) des conjugués pegylés (solutions stock dans l'HEPES) successivement après l'agent de compaction.

- *PEIb (25 kDa) ou JetPEITM* : L'ADN est dilué dans une solution de NaCl à 150 mM à une concentration finale de 60 μ M pour les études sur cellules *in vitro* et 15 μ M pour les expériences de DLS/zétramétrie, et la quantité désirée de PEIb ou JetPEI est additionnée à partir d'une solution stock dans l'HEPES (10 mM) ou dans l'eau (7,5 mM), respectivement. La suspension est agitée à température ambiante pendant 1 h avant utilisation. Les complexes décorés sont obtenus par addition de 2, 5, 10 ou 20 mol% des conjugués pegylés (solutions stock dans l'HEPES) à la moitié du temps d'agitation (i.e. 30 min).

V. ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES

V.1 EVALUATION DE L'ETAT DE COMPACTION DE L'ADN – ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Les formulations de complexes d'ADN (20 μ L, 0,4 μ g de plasmide) sont soumises à une séparation par électrophorèse pendant 30 min sous 150 V à travers un gel à 0,8 % en agarose imprégné de BET (1 μ L d'une solution à 10 mg/mL pour 20 mL de gel), dans un tampon TAE 1X (TRIS-acétate-EDTA). La plaque est ensuite visualisée et photographiée sur un transilluminateur UV.

V.2 EXCLUSION DU BROMURE D'ETHIDIUM

Les complexes sont formulés à partir d'ADN préalablement marqué au bromure d'éthidium (solution stock de BET à 30 μ M dans l'HEPES), à raison d'une molécule pour vingt-cinq paires de bases. Les formulations fraîchement préparées (30 μ L, BET 2,5 μ M) sont ensuite placées dans une plaque 384 puits et l'intensité de fluorescence (F , $I_{ex} = 520$ nm, $I_{em} = 590$ nm) est mesurée à $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ avec un lecteur de plaque Tecan GENios Pro (Männedorf, Switzerland). L'intensité relative de fluorescence d'une formulation x est calculée suivant l'équation $IRF_{(x)} = [F_{(x)} - F_{(0)}] / [F_{ADN} - F_{(0)}] \times 100$, avec $F_{(x)}$ l'intensité de fluorescence de la formulation x en présence de BET dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4), $F_{(0)}$ l'intensité de fluorescence du BET sans ADN dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4) et F_{ADN} l'intensité de fluorescence de l'ADN nu en présence de BET dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4).

V.3 DISSOCIATION DES COMPLEXES EN SOLUTION SALINE

Les complexes ADN/Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** sont formulés à N/P 10 puis décorés ou non avec 10 mol% de conjugué Lip-Asp₅-PEG-OMe **9a(p₅)**. Des concentrations croissantes en NaCl (0-250 mM) sont ensuite ajoutées aux formulations pour induire la dissociation des complexes. Finalement, les formulations sont soumises à l'intercalation du BET (solution stock de BET à 100 μ M dans l'HEPES), puis transférées dans des plaques 96 puits. La dilution assure une concentration finale de 60 μ M en ADN et de 2,5 μ M en BET dans chaque puits. L'intensité de fluorescence (F , $I_{ex} = 520$ nm, $I_{em} = 590$

nm) est mesurée à $25,0 \pm 0,5$ °C, puis les données sont retraitées comme ci-dessus (cf. **paragraphe V.2**).

V.4 ETUDE DU CYCLE 1,2-DITHIOLANE – SPECTROMETRIE UV-VISIBLE

L'absorbance UV (250-400 nm) du détergent Lip-C₆-NH₃⁺ **3a** (100 µL, 6 mM) dans l'HEPES (20 mM, pH 7,4) est mesurée sur un spectrophotomètre UV-visible (Varian) pour visualiser l'absorbance maximale (I_{\max}) du cycle 1,2-dithiolane à 333 nm.

V.5 TAILLE ET POTENTIEL ZETA DES COMPLEXES – DIFFUSION QUASI-ELASTIQUE DE LA LUMIERE (DLS) ET DIFFUSION DE LA LUMIERE PAR ANALYSE DE PHASE ET MESURE EN MODE MIXTE (M3-PALS)

La taille moyenne des nanoparticules d'ADN et leur potentiel zêta sont mesurés avec un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Paris) à 25°C en utilisant les paramètres suivants : temps d'accumulation, automatique ; 3 mesures par échantillon ; viscosité du milieu, 1,054 cP ; indice de réfraction du milieu, 1,33 et mode polydisperse pour la DLS ; angle de diffusion, 173° ; $\lambda = 633$ nm ; constante diélectrique du milieu, 80 et approximation de Smoluchowski $F(Ka) = 1,5$ pour le potentiel zêta. Chaque formulation est analysée en triplicate et les données sont analysées grâce au logiciel DTS fourni avec l'appareil. Les résultats indiqués pour un échantillon représentent la moyenne (\pm écart-type) de ces mesures.

V.6 TAILLE ET MORPHOLOGIE DES COMPLEXES – MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Des grilles métalliques recouvertes d'un film de Formvar et de carbone sont préalablement rendues hydrophiles par décharge cathodique en atmosphère raréfiée (*glow discharge*), puis placées sur de petites gouttes d'échantillons. Après 1 à 3 minutes de contact, les grilles sont soumises à une coloration négative grâce à quelques gouttes d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 1%. Elles sont ensuite séchées puis observées avec un microscope électronique CM12 (Philips) en conditions standard d'utilisation. Deux expériences sont réalisées pour chacune des formulations.

VI. ETUDES SUR CELLULES *IN VITRO*

VI.1 CULTURE CELLULAIRE

Les lignées cellulaires adhérentes COS-7 (cellules rénales cancéreuses du singe vert africain) et HeLa (cellules de carcinome épithélioïde humain, col utérin) ont été cultivées sous atmosphère humidifiée à 37°C et 5% en CO₂ en milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) supplémenté avec 100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10% (v/v) de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF, Invitrogen).

VI.2 TRANSFECTION *IN VITRO* – MESURE DE LA LUCIFÉRASE

Vingt-quatre heures avant transfection, les cellules COS-7 ou HeLa sont mises en culture à une concentration de $2 \cdot 10^4$ cellules/puits dans des plaques 96 puits en milieu de culture DMEM supplémenté en SVF (10%, v/v) sous atmosphère humidifiée à 37°C et 5% en CO₂. Les complexes d'ADN à étudier sont dilués dans 100 µL de DMEM (avec ou sans SVF (10%, v/v)) de façon à avoir 0,5 µg d'ADN par puits (15 µM en ADN). Le milieu de culture est enlevé et remplacé dans chaque puits par 100 µL des complexes dilués. Après 4 h et 24 h, 50 puis 100 µL de milieu supplémenté en SVF sont ajoutés de façon à avoir 10% (v/v) de SVF au final. Après 48 h, la transfection est stoppée, le milieu de culture est enlevé puis les cellules sont lavées deux fois avec 100 µL de tampon phosphate salin 1X (PBS, Invitrogen) et enfin lysées avec 50 µL de tampon de lyse (1X) (Promega, Charbonnières, France). Les lysats sont congelés à -32°C puis trois cycles de décongélation/recongélation sont réalisés pour améliorer l'efficacité de la lyse. L'activité de la luciférase est mesurée dans des plaques 96 puits par luminométrie (Tecan GENios Pro, Männedorf, Switzerland) en mode dynamique pendant 10 s sur 20 µL de chaque lysat, grâce au kit « *luciferase assay determination* » (Promega). La concentration en protéine dans chaque puits est déterminée par le test à l'acide bicinchonique (BCA) (Pierce, Montluçon, France). L'activité de luciférase est calculée en femtogrammes (fg) de luciférase par mg de protéines. La viabilité est calculée comme le rapport de la quantité totale de protéines par puits de cellules traitées sur la quantité moyenne de protéines par puits de cellules non traitées. Chaque formulation est testée en triplicate et le résultat est donné comme la moyenne des données \pm écart type.

En présence d'un inhibiteur du réseau de microtubule

Après 24 h de culture cellulaire, le milieu est éliminé puis les cellules sont lavées avec 100 µL de PBS (1X) et traitées avec une solution de nocodazole (Sigma-Aldrich) à 30 µM dans le DMEM non supplémenté pendant 1 h. Les cellules sont à nouveau lavées deux fois avec du DMEM sans SVF avant l'ajout des complexes, et le protocole est continué comme décrit ci-dessus.

En présence d'un agent endosomolytique

Après 24 h de culture cellulaire, les complexes sont dilués dans 100 µL de DMEM contenant 100 µM de chloroquine (Sigma-Aldrich). Le milieu de culture est enlevé et remplacé dans chaque puits par 100 µL des complexes dilués. Après 4 h de transfection en présence de l'agent endosomolytique, le milieu est aspiré, les cellules sont lavées avec 100 µL de PBS (1X) puis remise en présence de DMEM supplémenté avec 10% de SVF (150 µL). 100 µL de milieu sont à nouveau ajoutés après 24 h de transfection. Après 48 h, la transfection est arrêtée et le protocole poursuivi comme décrit plus haut.

VI.3 INTERNALISATION CELLULAIRE – CYTOMETRIE DE FLUX

Pour ces études, l'ADN est marqué avec du BET à raison d'une molécule pour 150 paires de bases (i.e. 38 molécules/plasmide) avant l'addition de l'agent de compaction. Les complexes d'ADN sont ensuite dilués dans 500 μ L de DMEM supplémenté avec 10% de SVF (v/v) de façon à avoir 2,5 μ g d'ADN par puits. Vingt-quatre heures avant l'expérience, les cellules COS-7 sont mises en culture à une concentration de 1.10^5 cellules/puits dans des plaques 24 puits en milieu de culture DMEM supplémenté en SVF (10%, v/v) sous atmosphère humidifiée à 37°C et 5% en CO₂. Le milieu de culture est enlevé et remplacé dans chaque puits par 500 μ L des complexes dilués. Après 4 h d'incubation à 37°C, le milieu de culture est enlevé puis les cellules sont lavées avec 500 μ L de PBS (1X). Pour éliminer les interactions non spécifiques résiduelles, les cellules sont lavées avec 500 μ L d'une solution de sulfate de dextran dans le PBS 1X (1 mg/mL), puis incubées pendant 15 min sous atmosphère humidifiée à 37°C et 5% en CO₂ avec 500 μ L de DMEM sans SVF contenant 200 mg/L d'ADN de thymus de veau. Les cellules sont alors lavées deux fois avec 500 μ L de PBS (1X) froid, décrochées par trypsination (trypsine-EDTA 1X, Invitrogen) puis suspendues dans 1 mL de DMEM à 10% en SVF. Après centrifugation (5 min, 1200 rpm), les cellules sont à nouveau lavées deux fois avec du PBS froid puis resuspendues dans une solution de PBS à 1% en SVF. La fluorescence des cellules est mesurée par cytométrie de flux (FACS Calibur, BD Biosciences) en utilisant un laser à argon (excitation à 360 nm pour le BET). La granulation, la taille et l'intensité de fluorescence (émission à 590 pour le BET) sont enregistrées à la vitesse de 300 cellules/s. Les données sont analysées grâce au logiciel winMDI 2.8.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J Org Chem* **1997**, 62, 7512-7515.
2. Santaella, C.; Vierling, P.; Riess, J. G., New perfluorinated phospholipids as injectable amphiphiles: Synthesis, preliminary physicochemical and biocompatibility data. *New J Chem* **1991**, 15, 685-692.
3. Lu, X.; Long, T. E., Asymmetric synthesis of monocyclic β -lactams from L-cysteine using photochemistry. *Tetrahedron Lett* **2011**, 52, 5051-5054.
4. Le Gourriérec, L.; Di Giorgio, C.; Greiner, J.; Vierling, P., Formulation of PEG-folic acid coated nanometric DNA particles from perfluoroalkylated cationic dimerizable detergents and in vitro folate-targeted intracellular delivery. *New J Chem* **2008**, 32, (11), 2027-2042.
5. Myers, A. G.; Gleason, J. L.; Yoon, T.; Kung, D. W., Highly practical methodology for the synthesis of D- and L- α -amino acids, N-protected α -amino acids, and N-methyl- α -amino acids. *JACS* **1997**, 119, (4), 656-673.
6. Parassol, N.; Bienvenu, C.; Boglio, C.; Fiorucci, S.; Cerezo, D.; Yu, X.-M.; Godeau, G.; Greiner, J.; Vierling, P.; Noselli, S.; Di Giorgio, C.; Van De Bor, V., In vivo characterization of dynein-driven nanovectors using drosophila oocytes. *PLoS ONE* **2013**, 8, (12), e82908.
7. Fields, G. B.; Noble, R. L., Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* **1990**, 35, (3), 161-214.
8. Levison, M. E.; Josephson, A. S.; Kirschenbaum, D. M., Reduction of biological substances by water-soluble phosphines: Gamma-globulin (IgG). *Experientia* **1969**, 25, 126-127.
9. Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M., Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J Org Chem* **1991**, 56, (8), 2648-2650.
10. Chattopadhyay, A.; London, E., Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal Biochem* **1984**, 139, (2), 408-412.
11. Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **1959**, 82, (1), 70-77.
12. Charrat, C.; Biscotti, A.; Godeau, G.; Greiner, J.; Vierling, P.; Guigonis, J. M.; Di Giorgio, C., Formulation of highly functionalizable DNA nanoparticles based on 1,2-dithiolane derivatives. *ChemBioChem* **2015**, 16, (5), 792-804.

CONCLUSION GENERALE

En ce début de XXI^{ème} siècle, la thérapie génique n'en est plus à ses débuts, même si de nombreux points restent à améliorer pour en faire une solution thérapeutique de premier choix. Alors que les vecteurs viraux demeurent les plus utilisés dans les essais cliniques, les recherches sont aujourd'hui orientées vers le développement de vecteurs non viraux plus performants, multicomposants et multifonctionnels, que l'on qualifie de « virus artificiels ». Ces édifices sont idéalement dotés de tous les éléments nécessaires pour transgresser efficacement les barrières physiologiques et véhiculer le transgène jusqu'à son site d'action. Toutefois, il serait utopique de penser qu'un système universel de transfert de gènes puisse un jour exister. En effet, chaque indication thérapeutique requiert une attention particulière, nécessitant d'adapter et d'optimiser les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des vecteurs.

Au niveau intracellulaire, les vecteurs non viraux font face à de nombreuses barrières pour conduire à une expression effective du transgène. Ils doivent être en mesure de sortir des endosomes, de circuler dans le cytoplasme pour conduire l'ADN porteur du gène thérapeutique jusqu'au noyau, et enfin de traverser l'enveloppe nucléaire puis exprimer efficacement et durablement le gène thérapeutique. Bien que chacune de ces étapes ait fait l'objet de travaux intenses, le routage intracellulaire du gène vers le noyau reste relativement peu étudié. La diffusion passive du gène jusqu'au noyau cellulaire est rendue difficile par la grande viscosité du cytoplasme et la présence de nucléases. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse a été d'apporter des solutions aux problèmes de trafic intracellulaire des vecteurs synthétiques vers le noyau, en favorisant un transport actif par les acteurs du cytosquelette que sont entre autres, les microtubules et leur moteur moléculaire rétrograde associé, la dynéine cytoplasmique de type I. Nous avons ainsi fonctionnalisé des nanovecteurs d'ADN par un peptide ciblant les chaînes légères LC8 de la dynéine cytoplasmique de type I (DLC8-AS).

Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont effectivement montré sur un système modèle à base de fluosphères en polystyrène, que la fonctionnalisation par des DLC8-AS permettait une accumulation périnucléaire très efficace des nanoparticules, à condition d'avoir un grand nombre de ces séquences à leur surface. De tels taux de ligands sont inenvisageables dans le cas de complexes d'ADN, car ils affecteraient grandement la stabilité colloïdale. Par ailleurs, des études récentes ont montré que des séquences DLC8-AS, sous leur forme dimérisée, augmentent grandement l'affinité vis-à-vis des chaînes légères LC8 de la dynéine. Nous avons donc choisi d'utiliser des dimères de DLC8-AS pour compenser ces faibles taux de fonctionnalisation tout en espérant conserver suffisamment d'affinité pour LC8. Le peptide de liaison à LC8 choisi pour mener cette étude, nommé BS69, est issu de la protéine adénovirale BS69. Parmi toutes les séquences testées avec les fluosphères fonctionnalisées, c'est celle qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats en termes de localisation et d'agrégation périnucléaire.

Pour explorer ce projet, trois systèmes distincts ont été utilisés pour leur capacité à donner, sous certaines conditions, des NPs de petites tailles avec une distribution monodisperse, c'est-à-dire des populations qui, en théorie, sont plus aptes à diffuser dans les fluides biologiques.

- **SYSTEME BASE SUR DES DERIVES DU 1,2-DITHIOLANE (PARTIE II, CHAPITRE II)**

Nous avons développé un système basé sur des dérivés de l'acide lipoïque pour tirer partie des caractéristiques d'oligomérisation et de bioréduction du motif 1,2-dithiolane. Le système consiste alors à combiner interactions électrostatiques et polymérisation pour formuler des NPs d'ADN fonctionnalisées par des séquences DLC8-AS dimériques, suivant un processus en deux étapes :

- (i) condensation de l'ADN par un amphiphile cationique et polymérisable,
- (ii) fonctionnalisation de la surface des NPs obtenues par des conjugués pegylés polyanioniques et polymérisables, portant un dimère de DLC8-AS à l'extrémité des PEG.

Dans le cadre d'une étude préliminaire sur un modèle simplifié sans ligand DLC8-AS, nous avons montré que l'amphiphile cationique polymérisable synthétisé, Lip-C₆-NH₃⁺, était très efficace en tant qu'agent de compaction de l'ADN. Des populations monodisperses de NPs d'ADN cationiques de tailles avoisinant 100 nm ont effectivement été obtenues. Malgré les différentes expériences menées, seules des preuves indirectes de la polymérisation du motif 1,2-dithiolane ont pu être mises en évidence. Nous avons également synthétisé de façon efficace, suivant une stratégie mixte alliant la chimie sur support solide et en solution, des conjugués polymérisables et polyanioniques comportant trois ou cinq résidus aspartate ainsi qu'un long polyéthylène glycol, Lip-Asp_{3 ou 5}-PEG_{5K}-OMe. Nous avons démontré grâce à des expériences de diffusion de la lumière et de zétamétrie que la combinaison charges anioniques/motifs polymérisables produisait les meilleurs taux de fonctionnalisation. Par exemple, les conjugués pegylés polymérisables et penta-anioniques vont jusqu'à inverser la charge cationique des NPs d'ADN après fonctionnalisation. Cette caractéristique peut s'avérer intéressante pour limiter les interactions non spécifiques avec les constituants biologiques. Cependant, ce système souffre d'une limitation sérieuse probablement liée à sa trop faible biodégradabilité. Les ponts disulfures ne semblent pas réduits efficacement par les systèmes rédox intracellulaires, ce qui compromet une libération effective de l'ADN et, *in fine*, son expression. Ainsi, même dépourvues de fonctionnalisation de surface, les NPs cationiques d'ADN formées par le seul agent de compaction ont montré une faible efficacité de transfection *in vitro* sur cellules COS-7 qui nous a poussé à abandonner cette stratégie.

- **SYSTEME BASE SUR DES DERIVES CYSTEINE (PARTIE II, CHAPITRE III)**

Lors de précédents travaux, l'équipe a utilisé un amphiphile cationique dimérisable basé sur la cystéine, F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺, pour compacter efficacement l'ADN en NPs quasi-monomoléculaires (~ un plasmide par particule). Ces NPs ont ensuite été fonctionnalisées par une ancre hydrophobe pegylée et perfluoroalkylée dotée d'un ligand DLC8-AS. Pour autant, cette stratégie n'a pas permis une accumulation périnucléaire efficace des NPs après injection intracytoplasmique dans des oocytes de drosophiles. Ce problème a été attribué à un trop faible taux de fonctionnalisation des NPs. Afin d'optimiser le taux de séquences DLC8-AS en surface et mettre en évidence l'effet bivalent du ligand, nous avons ici synthétisé avec succès deux conjugués de fonctionnalisation, structurellement homologues de l'agent de compaction. Ainsi, deux amphiphiles perfluoroalkylés, portant également le résidu cystéine et un conjugué monomérique ou dimérique de type mono- ou bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) (BS69) susceptible de se lier à la dynéine ont été préparés suivant un protocole alliant phase solide et chimie Click.

Nous avons ensuite montré par des expériences de retard sur gel, de spectrofluorimétrie et de DLS/zétamétrie que, sous certaines conditions (concentration en ADN, en agent de compaction et en agent de fonctionnalisation), la combinaison de l'effet hydrophobe, de l'oligomérisation des fonctions thiol et de l'entropie permettait d'obtenir des NPs d'ADN monodisperses de faibles tailles (50-60 nm), qualifiées de quasi-monomoléculaires en ADN, décorées par un conjugué modèle mono-(PEG_{1,6K}-Ac). Ces NPs présentent des charges de surface négatives ou positives (selon la quantité d'amphiphile cationique). De façon très remarquable, les expériences *in vitro* sur cellules HeLa ont révélé que seules les NPs négatives, fonctionnalisées avec le taux maximum autorisé pour maintenir la stabilité colloïdale, montraient une amélioration significative de l'efficacité de transfection (jusqu'à 250 fois par rapport aux NPs nues), et ce indépendamment de la nature mono- ou dimérique du ligand DLC8-AS porté. A ce stade, aucun effet lié à la bivalence du ligand n'a donc pu être conclu et seul un effet de seuil est mis en évidence. Afin d'éprouver ce résultat, nous avons contrôlé le degré d'oxydation des fonctions thiol du motif cystéine sur les deux conjugués mono- ou bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) (BS69). Un test d'Ellman nous a montré que la grande majorité des thiols était déjà sous leur forme oxydée (disulfure) avant leur utilisation en co-formulation avec l'amphiphile cationique dimérisable. Il s'avère donc qu'aucune conclusion hâtive concernant l'effet multivalent du ligand ne puisse être tirée. En effet, notre contrôle négatif (ligand mono-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS)) visant à confronter l'hypothèse de départ, se voit complètement remis en question puisque ce conjugué se présente en fait, dans sa grande majorité, comme déjà à l'état multivalent. Ces mêmes expériences menées en présence de nocodazole, un agent de dépolymérisation des microtubules, ont montré que les formulations actives (portant les ligands multivalents) étaient bien plus impactées que les polyplexes de JetPEI, ce qui démontre que les microtubules et leurs moteurs moléculaires rétrogrades (dynéine) sont bien impliqués dans le phénomène de transport intracellulaire.

Même si les niveaux de transfection atteints sont restés légèrement en deçà des polyplexes de JetPEI références (facteur 16), ce résultat est en tout point remarquable de part la nature des NPs impliquées (taille, charge). Il reste cependant à comprendre pourquoi seules les NPs fonctionnalisées présentant une charge de surface négative ont donné ces résultats. Alors que les NPs cationiques se sont montrées logiquement plus aptes à transfecter les cellules, aucun effet des ligands n'a pu être mis en évidence, probablement masqué par un niveau de transfection basal des NPs nues déjà trop important. Nous envisageons par la suite de marquer les NPs avec un fluorophore afin de tenter de suivre leur cheminement *in vitro*. Il serait également très intéressant de comprendre comment la transition entre les endosomes et le système microtubules/dynéine s'effectue. Des expériences de marquage des endosomes à leurs différents états (précoce, tardif) pourraient par exemple apporter des éléments de réponse.

- **SYSTEME BASE SUR DES DERIVES OCTAARGININE (PARTIE II, CHAPITRE IV)**

La dernière approche envisagée dans ce projet de thèse a consisté à utiliser des amphiphiles peptidiques de types polyarginine pour tirer partie des différents avantages liés à l'utilisation de séquences homoarginine amphiphiles, et qui concernent notamment leurs propriétés de condensation de l'ADN et de pénétration dans la cellule. Le protocole de formulation consiste alors à utiliser sur l'ADN de façon conjointe :

- (i) un amphiphile polycationique et perfluoroalkylé comportant huit résidus arginine,
- (ii) un amphiphile polycationique et perfluoroalkylé à huit résidus arginine conjugué à un dimère de PEG_{1,6K}-DLC8-AS (BS69) à son extrémité.

En se basant sur les résultats de la littérature concernant le dérivé stéaroyl-Arg₈ et sur notre expérience concernant la perfluoroalkylation de composés actifs, nous avons synthétisé un conjugué octaarginine perfluoroalkylé, F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH, en vue de l'utiliser comme agent de compaction de l'ADN. Nous avons également transposé avec succès, la stratégie de synthèse phase solide/chimie Click développée dans le cadre du projet cystéine à l'obtention des agents de fonctionnalisation octaarginine perfluoroalkylés mono- et bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) (BS69). La complexation de l'ADN avec F₄C₁₀-Arg₈-CH₂CCH puis la fonctionnalisation des NPs par un conjugué modèle mono-(PEG_{1,6K}-Ac) ont été étudiées par des expériences de retard sur gel, de spectrofluorimétrie et de DLS/zétamétrie. L'étude physico-chimique globale a montré que seul le rapport N/P 2 permettait d'obtenir des caractéristiques physiques acceptables en termes de taille et de polydispersité (NPs d'ADN de 160 nm). Ces NPs sont aussi anioniques et le restent même après fonctionnalisation par les conjugués pegylés. Ce système s'est cependant révélé totalement inefficace pour le transfert de gènes sur cellules HeLa, que ce soit avec les conditions non conventionnelles dictées par l'étude physico-chimique, ou avec des paramètres plus traditionnels (hauts rapports N/P). Ces résultats sont d'autant plus décevants que l'analogue perfluoroalkylé stéaroyl-Arg₈ a été décrit comme permettant

d'atteindre des niveaux de transfection élevés. Par ailleurs, l'absence totale d'effet lié aux ligands peut trouver une explication dans les très faibles concentrations en DLC8-AS utilisées dues à la nature octacationique des dérivés octaarginine. En effet, à N/P équivalent, la concentration en octacation est divisée par huit par rapport à un monocation (ex. F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺). Les formulations dans le système arginine présentent *in fine* 20 fois moins de DLC8-AS que leurs homologues dans le système cystéine.

Devant ce constat, nous nous sommes ensuite orientés vers une stratégie mixte, visant à décorer des polyplexes de PEI (PEIb et JetPEI) par les conjugués pegylés octaarginine mono- et bis-DLC8-AS (BS69) qui présentent néanmoins d'excellentes capacités d'interaction avec l'ADN. De façon remarquable, les polyplexes de PEIb (25 kDa) fonctionnalisés à hauteur de 5 mol% avec le conjugué bis-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS) (ce qui représente un taux dans la même gamme que celui du système cystéine), ont permis d'atteindre un niveau de transfection 50 fois supérieur à celui du JetPEI standard sur cellules HeLa. De façon plus intéressante surtout, les polyplexes fonctionnalisés par le conjugué monomérique mono-(PEG_{1,6K}-DLC8-AS), se sont quant à eux révélés inactifs. Ceci constitue donc une première preuve de validation du concept lié à l'effet bivalent des DLC8-AS. Enfin, nous avons vérifié par une expérience en présence de nocodazole que le réseau microtubulaire était bien impliqué. Là aussi, l'effet sur les polyplexes de PEIb fonctionnalisés est bien plus marqué que pour les autres formulations. Ce résultat est encourageant mais des expériences complémentaires sur un grand nombre de lignées cellulaires sont toutefois à envisager pour confirmer le concept.

Finalement, et quel que soit le système développé au cours de ce projet de thèse, amphiphiles (perfluoro)alkylés oligomérisables (lipoyl et cystéine) ou amphiphiles perfluoroalkylés octaarginine, nous nous sommes heurtés aux difficultés classiques de ce champ disciplinaire qui relèvent principalement de la nature intrinsèque du vecteur : taille, charge, stabilité, fonctionnalisation, biodégradabilité. Ces systèmes présentent des caractéristiques propres et des comportements tout à fait différents soulignant la grande difficulté de lier structure et activité. Il est apparu extrêmement difficile de choisir un système vecteur approprié pour montrer l'intérêt d'une fonctionnalisation par des dimères de séquences DLC8-AS sur le transport intracytoplasmique. En effet, alors que l'utilisation d'un système monomoléculaire en ADN conduisant à des NPs monodisperses et de petites tailles semblait pertinente de prime abord, ce sont *in fine* les propriétés globales du système final qui dictent l'efficacité. Il s'est avéré que, dans nos conditions d'expériences, la fonctionnalisation de polyplexes de PEI, dont les inconvénients principaux relèvent de la taille (polydispersité) et de la charge (toxicité), s'est avérée être la meilleure alternative. C'est en effet la fonctionnalisation de polyplexes de PEI qui a permis de confirmer que seule l'utilisation de dimères de DLC8-AS pouvait, malgré des taux de fonctionnalisation modérés, montrer un intérêt dans l'amélioration du routage intracellulaire par le recrutement de la dynéine et des microtubules. Toutefois, les barrières au transfert de gènes sont nombreuses, et l'optimisation de l'efficacité de

vecteurs non viraux ne repose pas uniquement sur l'amélioration du transport cytoplasmique. L'élaboration de virus synthétiques requiert la maîtrise globale de chacune des étapes limitantes du transfert de gènes. Une prochaine étape, si l'effet démontré par ce travail s'avère robuste, consisterait par exemple à envisager des combinaisons entre séquences DLC8-AS, ligands de ciblage cellulaire et/ou éléments fusogènes et séquences de pénétration nucléaire pour complexifier encore un peu plus ces systèmes moléculaires organisés et justifier plus pleinement l'appellation de « virus synthétiques ». Ne doutons pas que tous ces éléments, ensembles, nécessiteront de très nombreuses études avant de dégager des lignes d'amélioration certaines.

Pour conclure, malgré les efforts réalisés depuis près de quatre décennies dans l'élaboration de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes, les vecteurs viraux demeurent nettement plus performants. Ils sont d'ailleurs les plus utilisés jusqu'ici dans les nombreuses études cliniques menées à ce jour. Les virus ont en effet acquis pendant leur longue évolution tous les outils nécessaires pour surmonter les différentes barrières cellulaires et transférer de manière efficace leur matériel génétique à l'intérieur des cellules de mammifères. Espérer mimer des capsides virales en laboratoire par le biais de systèmes moléculaires organisés est un pari audacieux, qui s'est révélé bien plus complexe qu'imaginé au départ. La transposition de ces systèmes à des études *in vivo*, étape clés avant une quelconque étude préclinique, demeure toujours un problème. Les succès rencontrés par les équipes de recherche du domaine sont bien moins nombreux que les échecs, et la maîtrise de tous les paramètres menant au virus synthétique idéal et encore loin d'être totalement sous contrôle.

ANNEXES

ANNEXE 1

MESURE DE LA TAILLE PAR DLS

La DLS est une méthode couramment utilisée pour la caractérisation de la granulométrie de systèmes colloïdaux. Elle est basée sur la mesure du mouvement brownien de particules en suspension. La fréquence et l'amplitude de ce mouvement dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant. En effet, à une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus elle présente un mouvement brownien de fréquence et d'amplitude relatives importantes. De même, plus la valeur de la viscosité du solvant est faible (température plus élevée par exemple), plus ce mouvement brownien est rapide et ample pour une particule de taille donnée. Il est donc important de maîtriser la viscosité et la température du milieu. Le déplacement des particules sous l'effet de fluctuations de concentration est caractérisé par le coefficient de diffusion (D_T) qui, d'après la loi de Stokes-Einstein, est lui-même inversement proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule :

$$d_n = \frac{k_b T}{3 \eta_0 D_T}$$

Avec k_b : la constante de Boltzmann,

T : la température,

η_0 : la viscosité du solvant,

D_T : le coefficient de diffusion,

d_n : le diamètre hydrodynamique de la particule considérée.

Le coefficient de diffusion est déterminé en mesurant la vitesse de décroissance de l'intensité lumineuse d'un échantillon éclairé par un laser à l'aide d'un dispositif optique adéquat. L'étude de la fonction de corrélation résultant de la mesure, soit par la méthode des cumulants (solutions monodisperses) soit par la méthode de Contin (solutions polydisperses) permet d'extraire cette vitesse de décroissance. Celle-ci est ensuite convertie en coefficient de diffusion à partir de l'indice de réfraction du milieu, de la longueur d'onde de la lumière incidente et de l'angle de diffusion. En dernier lieu, le coefficient de diffusion mesuré est converti en diamètre hydrodynamique *via* l'équation de Stokes-Einstein.

MESURE DU POTENTIEL ZETA

La mesure du potentiel zêta permet d'accéder au potentiel électrique de la double couche présente à la surface de particules chargées en solution. Ce potentiel (assimilé à la charge résiduelle de l'objet en solution) est déterminant dans l'étude de la stabilité de suspensions colloïdales. Selon le modèle simplifié de Stern (**Figure 1**), une particule chargée en solution attire à sa surface les contre-ions de charge opposée. Ceux-ci vont s'organiser en une double couche autour de la particule qui va constituer une sorte d'atmosphère ionique. La première, appelée couche de Stern, est constituée d'ions peu mobiles fortement liés. La seconde est une couche plus diffuse d'ions de charge opposée qui sont plus mobiles bien que territorialement liés à la particule. C'est le potentiel au niveau de cette couche diffuse (plan de cisaillement) qui est appelé potentiel zêta. L'épaisseur de la double couche constitue la longueur de Debye ($-1/\kappa$, distance au-delà de laquelle les ions sont écrantés). Ce potentiel zêta est déterminé en mesurant la mobilité des particules sous l'effet d'un champ électrique. En effet, mobilité électrophorétique et potentiel zêta sont reliés par la loi de Henry ci-dessous :

$$U_E = \frac{2 \epsilon \zeta f(\kappa a)}{3 \eta}$$

Avec ζ : le potentiel zêta,

U_E : la mobilité électrophorétique,

ϵ : la constante diélectrique relative,

η : la viscosité,

$f(\kappa a)$: la fonction de Henry où κa mesure le ratio du rayon de la particule par rapport à l'épaisseur de la double couche électrique : en milieu aqueux pour des concentrations modérées d'électrolyte $f(\kappa a) = 1,5$ (approximation de Smoluchowski).

Ainsi, la viscosité, la constante diélectrique et la fonction de Henry étant connues, la mesure de la mobilité permet d'accéder directement au potentiel zêta.

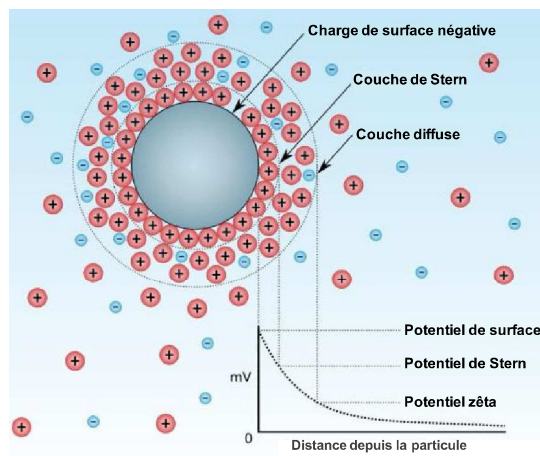


Figure 1 : Modèle de Stern de la double couche

ANNEXE 2

PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE CONFOCALE

La microscopie de fluorescence en mode confocale permet d'enregistrer l'image de la fluorescence émise dans un seul plan. Cette technique a permis de pallier l'inconvénient majeur de la microscopie en fluorescence, à savoir la perte de résolution due à l'émission de fluorescence des objets défocalisés qui se superpose à l'image du plan focal. Le traitement informatique associé permet d'afficher des images provenant du signal enregistré par un détecteur très sensible couplé à un photomultiplicateur et de reconstituer la distribution tridimensionnelle de la fluorescence. Le principe est illustré dans la **Figure 2**. La lumière incidente est focalisée sur l'ouverture d'un diaphragme d'illumination puis réfléchi par un miroir dichroïque qui conduit à l'excitation des fluorophores de l'échantillon. L'émission résultante provient alors de tous les plans focaux de l'échantillon. L'atout majeur de la microscopie confocale réside en la présence d'un second diaphragme, appelé pinhole, positionné de manière à ce que seule la lumière émise des points du plan de focalisation ne parvienne au détecteur. Les signaux parasites émis par les autres plans sont ainsi éliminés. Après détection, les images sont finalement numérisées.

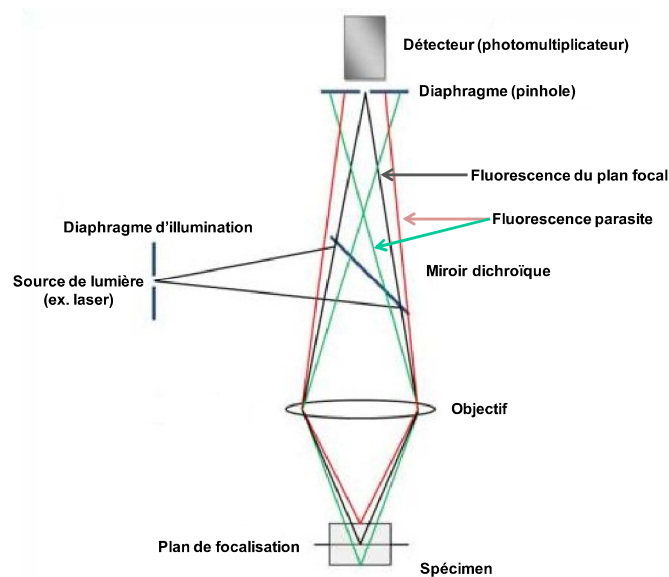


Figure 2 : Principe de la microscopie confocale

ANNEXE 3

PRINCIPE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

La cytométrie en flux permet l'étude qualitative et quantitative de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Les cellules en suspension dans un milieu sont aspirées par une pompe et envoyées une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser (**Figure 3**). Les signaux optiques diffusés et/ou émis par chaque cellule sont ensuite séparés par des filtres, collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés. L'appareil est équipé de plusieurs photomultiplicateurs capables de détecter plusieurs longueurs d'ondes d'émission différentes (Fluorescence-1, Fluorescence-2...), ce qui permet des analyses multiparamétriques. Les détecteurs captent ainsi la fluorescence émise par la cellule elle-même (auto-fluorescence), ou alors par un fluorochrome spécifiquement lié à la cellule. Aussi, outre la lumière émise par fluorescence, l'appareil traite aussi la lumière diffusée à deux angles principalement :

- diffusion frontale de la lumière (aux petits angles) (FSC, *Foward-Scattered Channel*) qui renseigne sur la taille des particules
- diffusion latérale de la lumière (à 90° du laser) (SSC : *Side-Scattered Channel*) qui renseigne sur la granulométrie des particules

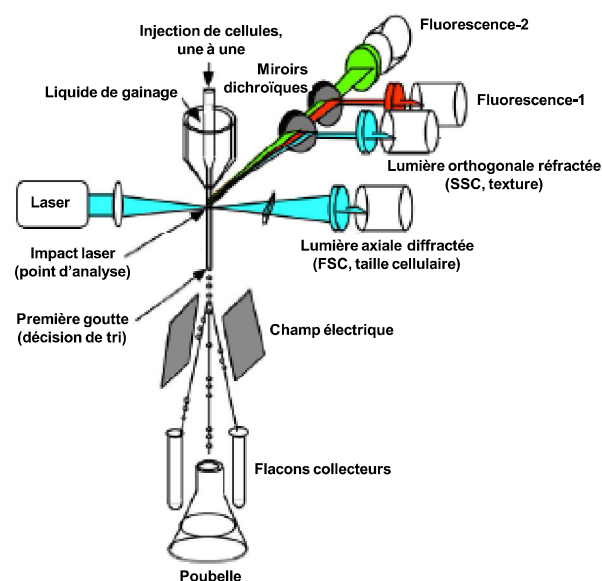


Figure 3 : Principe de la cytométrie en flux

Les résultats peuvent être représentés principalement sous deux formes :

- des histogrammes monoparamétriques (illustrés **Figure 4A**) qui permettent de visualiser un seul paramètre choisi : l'axe des abscisses représente l'intensité relative de fluorescence de la ligne considérée et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.
- des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes (illustrés **Figure 4B**) qui permettent de visualiser le nombre de cellules en fonction de deux signaux optiques simultanément. Il est aussi

possible de sélectionner au sein d'un cytogramme une zone spécifiquement choisie (« *gating* »). Ceci est utilisé pour :

- isoler une catégorie de cellules sur le tracé,
- permettre de quantifier seulement les paramètres issus de cette zone (écarter les débris cellulaires ou des agrégats),
- utiliser la logique booléenne pour inclure ou exclure d'autres zones d'intérêt.

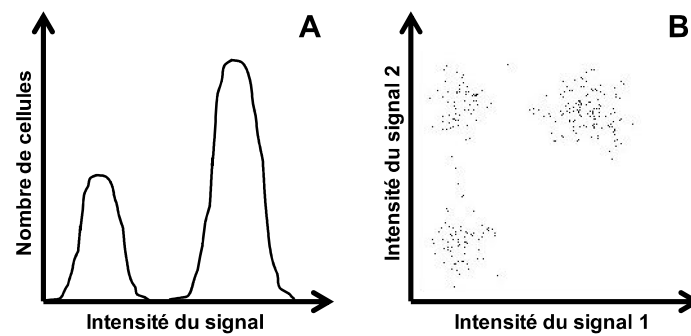


Figure 4 : Représentation monoparamétrique (A) et biparamétrique (B) des résultats de cytométrie en flux

ANNEXE 4

Le travail décrit **partie II, chapitre II** a fait l'objet d'une publication intitulée « *Formulation of Highly Functionalizable DNA Nanoparticles Based on 1,2-dithiolane Derivatives* » dans le journal ChemBioChem. Nous la joignons ci-après.

Formulation of Highly Functionalizable DNA Nanoparticles Based on 1,2-Dithiolane Derivatives

Coralie Charrat,^[a] Anaïs Biscotti,^[a] Guilhem Godeau,^[a] Jacques Greiner,^[a] Pierre Vierling,^[a] Jean-Marie Guigonis,^[b] and Christophe Di Giorgio^{*,[a]}

We describe the formulation of synthetic virus models based on ionic compounds bearing the polymerizable 1,2-dithiolane moiety. First, cationic amphiphiles containing the polymeric inducer were prepared and used to efficiently condense a DNA plasmid (pDNA) into a highly monodisperse population of small polymeric cationic DNA nanoparticles (NPs; $D_h \sim 100$ nm). These nonspecific cationic particles were then functionalized

with anionic PEGylated conjugates, also based on the 1,2-dithiolane motifs, in order to produce stable and fully dispersible stealth DNA nanoparticles. Our results show that both ionic interactions and polymerization based on the 1,2-dithiolane pattern occur and that they produce highly functionalizable nonviral DNA NPs.

Introduction

During the last decade, a new generation of nonviral DNA vectors ("synthetic" or "artificial" viruses) has emerged.^[1–6] These vectors (Figure 1) are supramolecular, multicomponent, multifunctional devices that still largely depend on cationic agents (either cationic lipids or polymers) to condense plasmid DNA (pDNA) efficiently.^[7]

Among the huge number of molecules and concepts envisaged for nonviral gene therapy, compounds combining ionic interactions and polymerizable properties appear particularly appealing, especially those based on reducible disulfide–thiol exchange. Indeed, it has been shown dimerizable or polymerizable cationic detergents based on cysteine residues used under their critical micelle concentration (CMC) were able to direct DNA compaction in a monomolecular manner (i.e., one pDNA per particle).^[8–11] The resulting properties, such as small size of the DNA complex and high monodispersity of formulations, represent unquestionable advantages in terms of diffusion and dispersion in biological fluids. However, efficient functionalization of such particles is particularly difficult to achieve and requires the synthesis of PEG- or PEG–ligand (in the case of targeting) conjugates with quite complex structures. For

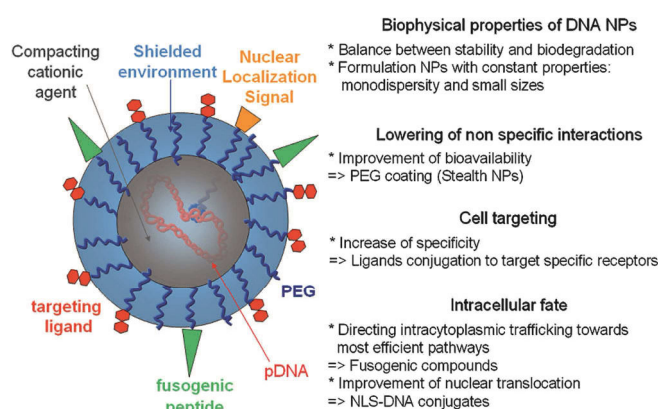


Figure 1. Synthetic virus with multiple functionalities.

example, Zuber and colleagues used a complex conjugate^[12] to coat the cystine-based "gemini" lipid–DNA particles with a PEG–folate envelope that was anchored to the DNA by a minor-groove-binding moiety. Dauty and colleagues^[13] reported the use of a lipid–PEG conjugate added after the monomolecular DNA compaction process. We reported a similar strategy with a lipid–PEG–folate dimer based on cysteine.^[14] The main problem with these strategies is the low solubility of the lipid conjugate, which needs to be added after completion of the monomolecular DNA condensation. This results in low functionalization efficiency of DNA nanoparticles (NPs) and inability to neutralize all the cationic charges,^[14] thus still leading to undesired nonspecific interactions, despite the presence of specific ligands.

With the aim of setting up a system that takes advantage of disulfide–thiol interchange chemistry for biocompatibility considerations, we looked at the possibility of using a polymerizable/reducible residue in a strategy that allows monomolecular DNA compaction as well as a more efficient and easier way of functionalization. We describe the preparation of polymerizable/reducible compounds and their formulation into synthetic

[a] C. Charrat, A. Biscotti, Dr. G. Godeau, Dr. J. Greiner, Dr. P. Vierling, Dr. C. Di Giorgio
Institut de Chimie de Nice, équipe Molécules Bioactives (Vectorisation & Diagnostic)
CNRS UMR 7272
Université de Nice–Sophia Antipolis, Faculté des Sciences
06108 Nice Cedex 2 (France)

[b] J.-M. Guigonis
Plateforme "Bernard Rossi"—Laboratoire TIRO (Transporteur en Imagerie Radiothérapie et Oncologie)
UMR E 4320 CEA/iBEB/STN-CAL
Université de Nice–Sophia Antipolis, Faculté de Médecine
28 Avenue de Valombrose, Nice 06107 (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201402657>.

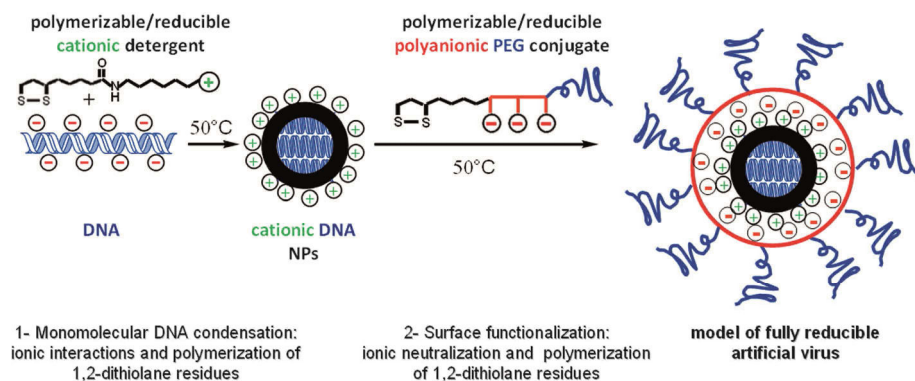


Figure 2. Two-step procedure to prepare highly functionalizable nonviral DNA vectors based on the combination of ionic interactions and polymerization/reduction through the 1,2-dithiolane motif.

virus models by using a combination of ionic interactions and polymerization induced by the 1,2-dithiolane pattern by a two-step process (Figure 2). The first step uses a cationic 1,2-dithiolane-based polymerizable/reducible detergent to drive the compaction of pDNA into a monodisperse population of tiny positively charged DNA NPs (as stated above). The second step involves complete decoration of the cationic surface (by simple mixing and gentle heating) of the newly formed DNA NPs with a polyanionic and polymerizable PEG conjugate based on the 1,2-dithiolane residue. We used a combination of surface charge neutralization and the surface anchoring system provided by the polymerizable/reducible 1,2-dithiolane residue to promote the formation of synthetic viruses.

Results and Discussion

Concept and controls

As previously stated, the objectives of this work consist in setting up an efficient and versatile way to produce a synthetic virus model for nonviral gene transfer.^[1–7] Based on this idea, our strategy has two driving forces:

Firstly, a polymerization/reduction system, triggered by the disulfide/thiol interchange chemistry of the 1,2-dithiolane moiety. The corresponding polymerizable/reducible cationic detergent that bears this motif should provide small sizes, monodispersity, and stability of DNA NPs once reticulated (while still allowing their biodegradability). 1,2-Dithiolane ring-opening, followed by subsequent intermolecular condensation into linear disulfide polymers under controlled and mild conditions has already been reported. It was shown to be initiated with small quantities of free thiol^[16–18] or by thermal polymerization.^[19–21] The 1,2-dithiolane motif should lead to higher degrees of polymerization (linear disulfide polymers), compared to regular thiols, which only form dimers. This should limit the reversibility of the system because of the increasing number of positive charges that act concomitantly with DNA phosphates. Furthermore, the chemistry of lipoic residues does not require selective protection/deprotection steps, unlike side-chain cysteine residues. Moreover, lipoate-based lipids have already

been successfully reported as valuable in a strategy for the redox-controlled delivery of DNA.^[22]

The second part of our strategy was electrostatic neutralization to decrease nonspecific interactions due to cationization of DNA complexes and to afford high dispersion. The excess of cationic charges required to prepare stable DNA NPs results in high nonspecific interactions with negatively charged plasma proteins during systemic circulation, thus leading to loss of bio-

availability. A reduction in the overall charge on the NP surface is possible through electrostatic interactions with anionic components coated on the NP surface. Similar strategies have been reported to use a layer-formulation process to successfully functionalize cationic NPs.^[23–25] To be efficient, our anionic coating must fulfill the same requirements as those of cationic detergents, that is, sufficiently hydrophilic as a monomer and promoting stronger interactions with the particles. A polymerizable/reducible anionic PEG conjugate based on a lipoyl scaffold and aspartate residues could meet these requirements. Indeed, anionic surface neutralization could act concomitantly with the anchor-based functionalization capabilities of the 1,2-dithiolane motif to provide enhanced decoration. Another benefit of using the lipoyl scaffold (rather than a cysteine one) is the more straightforward, easier synthetic protocol (no need to protect the thiol function; better solubility in a large range of solvents). The resulting high PEG grafting on the NP surface should result in nearly neutral and highly dispersive PEGylated DNA NPs, which could be further equipped with additional features (cell targeting ligands, cellular entry motifs, endosomal escape properties, and elements to increase migration to and internalization into the nucleus). Overall, these modifications should diminish cytotoxicity as well as reduce interactions with serum proteins and aggregation with blood components^[26–28] while producing a complete and functional “synthetic virus”.

The different polymerizable/reducible cationic detergents for DNA condensation and anionic PEG conjugates for the functionalization as well as various controls (see below) are given in Table 1.

Our polymerizable/reducible cationic detergent, Lip-C₆NH₃⁺, consists of a lipoylamide that results from the condensation of lipoic acid with 1,6-diaminohexane. An amide bond was chosen for connecting the lipoic part to the lipophilic ammonium, because lipoamide is efficiently reduced within mammalian cells by lipoamide dehydrogenase and thioredoxin reductase through NADPH/NADP⁺ control.^[29] This should trigger DNA release, based on reduction of the disulfide bond.

The polymerizable/reducible polyanionic PEG conjugates Lip-Asp₃[–] and -Asp₅-PEG-OMe come from lipoic acid, tri- or penta-aspartate peptide, and methoxy-ended amino PEG. Methoxy-ended PEG was chosen here for the proof of concept.

Table 1. Polymerizable detergent, PEG conjugates, and controls.

	Charged compounds	Neutral compounds
polymerizable/ reducible detergent	Lip-C ₆ NH ₃ ⁺ (cationic) 	
nonpolymerizable detergent	Oct-C ₆ NH ₃ ⁺ (cationic) 	
polymerizable/ reducible PEG conjugates	(p = 3) Lip-Asp ₃ -PEG-OMe (anionic) (p = 5) Lip-Asp ₅ -PEG-OMe (anionic) 	Lip-PEG-OMe
nonpolymerizable PEG conjugates	Oct-Asp ₃ -PEG-OMe (anionic) 	Oct-PEG-OMe

However, it can be replaced by PEG–ligand conjugates if specific targeting is desired. To facilitate interpretation of the results, control compounds were also prepared. The nonpolymerizable cationic detergent, Oct-C₆NH₃⁺, was chosen because it has a carbon skeleton homologous to that of Lip-C₆NH₃⁺ but lacks the polymerizable/reducible motif. Three PEG conjugate controls were synthesized: Oct-Asp₃-PEG-OMe, which bears, at physiologic pH, three anionic charges but not the 1,2-dithiolane polymerizable/reducible moiety; Lip-PEG-OMe, which contains the polymerizable/reducible motif but lacks anionic charges; and Oct-PEG-OMe, which contains neither the polymerizable/reducible moiety nor the anionic part.

Synthesis of detergent derivatives and PEG conjugates

The synthesis of cationic detergents and neutral PEG-ylated conjugates proceeded successfully in three (or four) and two steps, respectively, according to a straightforward procedure (Scheme 1). Using *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and *N*-hydroxysuccinimide (HOSu), lipoic or octanoic acid was converted in good yield into the activated succinimidyl esters **1a,b**. These activated acids were conjugated with *N*-Boc-1,6-diaminohexane (BocNH(C₆H₁₃)₂) to give **2a,b** in 87% yield. Finally, the *N*-Boc protecting group was removed under acidic conditions (TFA/CH₂Cl₂, 1:1) to provide the targeted detergents Lip-C₆NH₃⁺ and Oct-C₆NH₃⁺ in 64 and 72% yield, respectively, from commercial acids. The two corresponding neutral PEG conjugates, Lip-PEG-OMe and Oct-PEG-OMe (Scheme 1), were prepared by treating H₂N-PEG-OMe

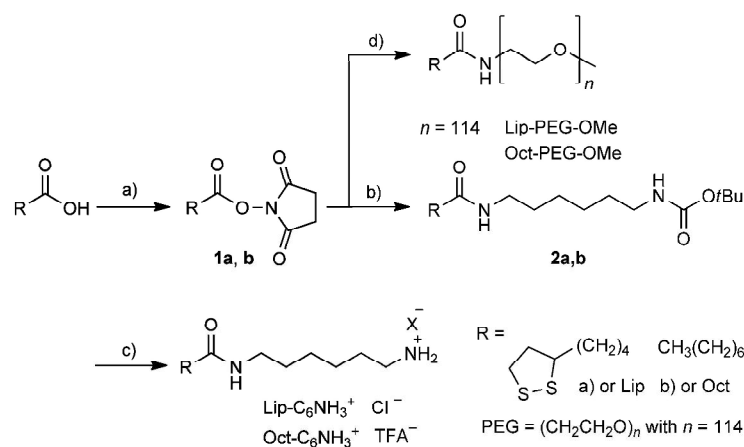
with activated acids **1a** and **b** (in excess to minimize unreacted starting PEGylated compound). The desired compounds were purified by size exclusion column chromatography and obtained in 90–92% yield.

Anionic PEG conjugates, either polymerizable/reducible (Lip-Asp₃-PEG-OMe and Lip-Asp₅-PEG-OMe) or not (Oct-Asp₃-PEG-OMe), were prepared by a mixed solid- and liquid-phase strategy (Scheme 2). 2-Chlorotrityl (2-Cl-Trt) resin was used as the solid-phase part.

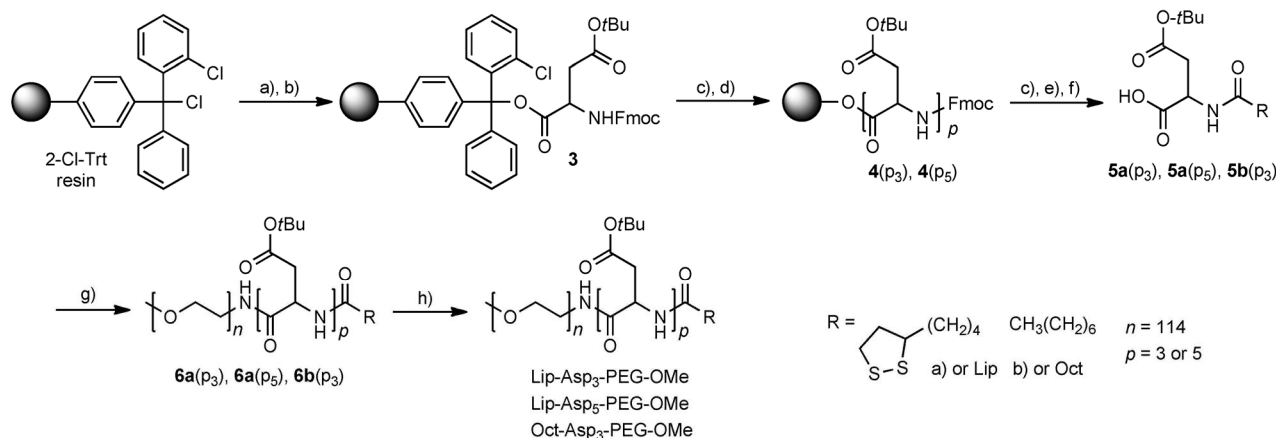
The protected lipoic-poly Asp moiety was first obtained, with a high efficiency, by a solid-phase procedure. For mono-functionalization of the aspartic acid residue of **5a(p3)**, **5a(p5)**, and **5b(p3)** with PEGylated amine, a second stage used

classical liquid-phase. This mixed strategy led to the preparation of Lip-Asp₃-PEG-OMe, Lip-Asp₅-PEG-OMe, and Oct-Asp₃-PEG-OMe in 52, 65, and 61% overall yields, respectively, from the resin.

Three or five protected aspartic acids (Fmoc-Asp(OTBu)-OH) were successively attached to a 2-Cl-Trityl resin according the standard Fmoc coupling procedure with DIC/HOBt.^[15] After the first coupling, the remaining binding sites of the resin were capped by treatment with methanol. After the last coupling, the *N*-Fmoc terminal was deprotected by piperidine-DMF, then the regenerated amine was reacted with preactivated lipoic (or octanoic) acids **1a** and **b**. After amide formation, cleavage from resin under soft acidic conditions (TFE/AcOH/CH₂Cl₂ 1:1:4)



Scheme 1. Synthesis of cationic detergents and neutral PEG conjugates. a) HOSu, DCC, CH₂Cl₂, RT; b) NH₂(CH₂)₆NHBoc, DIPEA, CH₂Cl₂, RT; c) MeOH, CH₃COCl, RT (for Lip-C₆NH₃⁺) and TFA/CH₂Cl₂ 1:1, RT (for Oct-C₆NH₃⁺); d) NH₂-PEG-OMe, DIPEA, CH₂Cl₂, RT.



Scheme 2. Synthesis of polyanionic PEG conjugates. a) Coupling step: Fmoc-Asp(OrtBu)-OH (2 equiv vs. resin), DIPEA (3 equiv), DMF, 1 h, RT (repeat step 2×) then washing with DMF (3×), CH₂Cl₂ (3×); b) 65:10 DMF/MeOH then washing DMF (3×), CH₂Cl₂ (3×); c) 4:1 DMF/piperidine (repeat step 4×); d) Fmoc-Asp(OrtBu)-OH (2 equiv), HOBt (3 equiv), DMF, DIC (2.4 equiv), 15 min (repeat step 2×) then washing with DMF (3×); (step c) repeat 2× for Asp₃ and 4× for Asp₅; e) **1a** or **1b** (2 equiv), DIPEA (2 equiv), DMAP (0.1 equiv), CH₂Cl₂ (repeat step 2×) then wash with DMF (3×); f) 4:1:1 CH₂Cl₂/TFE/CH₃CO₂H then wash with CH₂Cl₂ (3×) (repeat step 1×); g) **5a,b** (1.5 equiv), HOBt (2.5 equiv) et DIC (2 equiv), CH₂Cl₂ then DIPEA, NH₂-PEG-OMe (1 equiv); h) TFA/CH₂Cl₂ 1:1.

allowed full recovery of the corresponding tri- or penta-Asp(OrtBu) derivatives **5a**(p₃), **5a**(p₅), and **5b**(p₃) with a free C-terminal acidic residue. Then, each peptide was reacted with H₂N-PEG-OMe in a classical DIC/HOBt coupling procedure to afford the PEGylated *tert*-butyl esters **6a**(p₃), **6a**(p₅), and **6b**(p₃). This protection was quantitatively removed by TFA in CH₂Cl₂ to give the three targeted anionic PEGylated conjugates, Lip-Asp₃-PEG-OMe, Lip-Asp₅-PEG-OMe, and Oct-Asp₃-PEG-OMe.

Characterization of self-assembling capabilities

DNA retardation assay: Thermal polymerization of 1,2-dithiolane and/or 1,2-dithiane residues has been demonstrated in bulk, without needing an initiator.^[19–21] We hypothesized that DNA could act as a matrix as the concentrated localized lipoyl residues could mimic bulk conditions. The ability of Lip-C₆NH₃⁺ detergent to compact pDNA by thermal polymerization was evaluated in comparison with the analogous sulfur-free compound Oct-C₆NH₃⁺. The two formulations were prepared at the high *N/P* ratio of 10 (*N*, number of protonable amines carried by the compacting agent; *P*, number of phosphate groups of the plasmid) to ensure a large excess of the condensing agent. After 1 h to establish equilibrium, thermal polymerization was induced by heating the suspension at 50 °C overnight. The 0.4% agarose gel for the DNA gel retardation assay on is shown in Figure 3. As clearly shown by EB staining, only the cationic and polymerizable detergent was able to efficiently promote full DNA compaction. According to a reported monomolecular condensation mechanism,^[8–11] cationic detergents must be used under their critical aggregation concentrations to direct DNA compaction for the highest number of nanoparticles, and hence to the smallest achievable size. The Lip-C₆NH₃⁺ detergent concentration used to formulate our DNA NPs, at the higher *N/P* 10, was 300 μM. At this concentration, no aggregation was evident prior the addition of pDNA, as determined by a DLS experiment (data not shown). The re-

versibility of ionic interactions combined with fast equilibrium ensured full dispersion at the early stages of condensation. As a consequence, entropy drove the condensation towards the highest number of complexes and hence to smaller particles with high monodispersity. The 1,2-dithiolane group must play an important role in the stability of these complexes. This is probably attributable to the polymerization of these residues into linear disulfide polymers once nanoparticles have formed. As postulated, DNA probably acts as a concentrating matrix for detergents. Once the aggregation concentration is reached, the proximity of structures probably allows the polymerization to proceed.

Fluorescence exclusion dye assay: In order to examine the polymerization process, we set up a spectrofluorimetry experi-

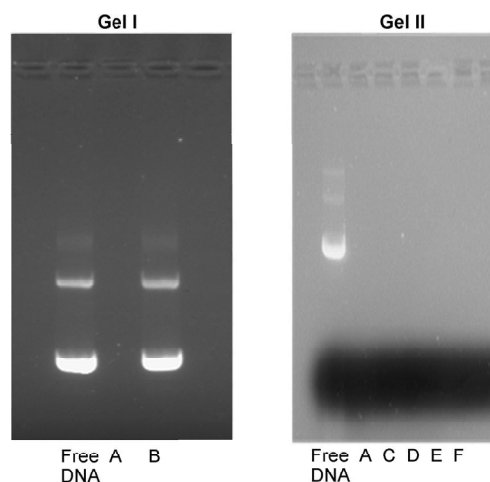


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of the detergent/DNA complexes. Gel I: formulated with Lip-C₆NH₃⁺ (lane A) or Oct-C₆NH₃⁺ (lane B) at *N/P* = 10 relative to free DNA. Gel II: Lip-C₆NH₃⁺ detergent/DNA complexes (lane A), or decorated with anionic PEG conjugate Lip-Asp₃-PEG-OMe at 1 (lane C), 2 (lane D), 5 (lane E), or 10 mol% (lane F), relative to free DNA.

ment with ethidium bromide (EB) dye exclusion. pDNA was stained with EB (one EB staining molecule per 25 bp), and DNA complexes were then formed with the Lip-C₆NH₃⁺ detergent (N/P = 0.1–8), without or with polymerization induction (i.e., no heating, or heating at 50 °C overnight), or with a large excess of dithiothreitol (DTT, 10 mM) to ensure total reduction of the 1,2-dithiolane moiety. Polyethylenimine (PEI, branched 25 kDa)/DNA polyplexes were used as a control. The results are given as relative fluorescence [%], that is, the percentage of EB that remains with the DNA upon the addition of the compacting agent (Figure 4).

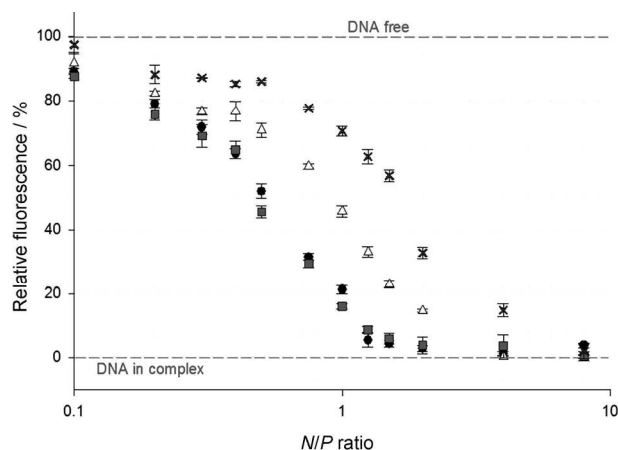


Figure 4. Ethidium bromide displacement assay at 25 °C for DNA/Lip-C₆NH₃⁺ nanoparticles freshly prepared (●), after overnight incubation at 50 °C (■), or in the presence of 10 mM DTT (×); control: DNA/PEI nanoparticles (△). Displacement assay at various N/P ratio for pDNA (phosphate concentration 60 μM) in 20 mM HEPES, pH 7.4, and stained with EB (100 μM in 20 mM HEPES, pH 7.4). Relative fluorescence emission (600 nm) was determined with excitation at 520 nm.

Apparent association constants (K_A^*) for the different compacting agents were estimated from titration curves (Figure 4), by assuming a 1:1 ammonium/phosphate stoichiometry and using the simplified equation $K_A^* = 1/(C^* - 0.5 \times C_{DNA})$, where C^* is the concentration of cationic monomeric unit at the transition point, and C_{DNA} is the total DNA concentration. K_A^* was 0.01 μM⁻¹ for the lipoyl derivative under reductive conditions, 0.09 μM⁻¹ for PEI/DNA polyplexes, and 0.36 μM⁻¹ for the lipoyl derivatives formed with or without polymerization induction (heating). Clearly, the excess of DTT strongly decreases (~35 times, based on respective K_A^*) the affinity towards DNA. However, no direct evidence of thermal polymerization could be proved, as the apparent constant association (K_A^*) of NPs formulated with lipoyl derivatives, without or with polymerization induction (50 °C heating), could not be discriminated. However, DNA complexes formed with the cationic lipoyl derivative were about four times more stable than PEI polyplexes. This strongly suggests an alternative mechanism for this stability enhancement. DNA condensation with cationic detergents is a known process.^[30] Condensation with detergent is highly reversible because of fast exchange with the medium. DNA/Lip-C₆NH₃⁺ complexes exhibited a K_A^* value superior even to that for PEI

(four times); polycations are known for strong affinity toward (negative) phosphate, thus likely explaining the evidence of polymerization even when no heat was applied. Indeed, the S–S bond of 1,2-dithiolane motif can be homolytically cleaved by heat, light,^[18] and even in water.^[31] We suppose that our buffer was sufficiently basic to yield radicals that subsequently polymerized into disulfide polymers. Even if only a small fraction of radical is present at physiologic pH^[32] (so the rate of thiol–disulfide interchange would be slow), it has been shown that DNA, acting as a concentrating medium matrix, can greatly enhance this reaction.^[8] All these properties favor smooth polymerization of 1,2-dithiolane motifs when lipoamides are concentrated onto pDNA.

UV monitoring of the characteristic 333 nm 1,2-dithiolane chromophore: To rule out the possibility of polymerization of Lip-C₆NH₃⁺ detergent prior to interaction with pDNA, we monitored the UV signal at 333 nm (characteristic wavelength for the 1,2-dithiolane ring (Figure 5)).^[18,19] Lip-C₆NH₃⁺ detergents were stable in the buffer (HEPES 10 mM, pH 7.4), as evidenced by the unchanged absorbance over a period longer than that required for the experiment (~12 h; here, the signal was monitored for 24 h). This ensures that the Lip-C₆NH₃⁺ detergents are in a cyclic and monomeric form during the early stages of the condensation process, normally a prerequisite for the monomolecular condensation process to occur. Unfortunately, at the concentrations required for DNA condensation (60 μM phosphate), the signal was not detectable.

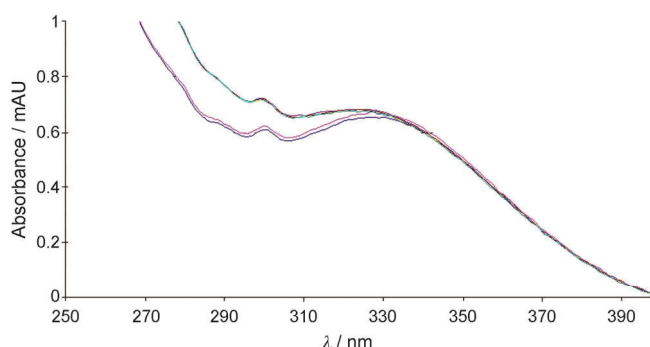


Figure 5. UV absorbance at 333 nm for Lip-C₆NH₃⁺ (6 mM) in HEPES (20 mM, pH 7.4) after 0 (—), 1 (—), 2 (—), 6 (—), 12 (—), or 24 h (—).

Decoration capabilities of the lipoyl-PEG conjugates.

DNA retardation assay: Synthetic virus-like NPs were obtained by the two-step process (Figure 2): formation of DNA NPs with a large excess of the Lip-C₆NH₃⁺ detergent (N/P = 10), followed by functionalization of their surfaces with polyanionic lipoyl-PEG conjugates. As attested by the absence of DNA staining in lanes A and C–F of gel II in Figure 3, the addition of a polyanionic lipoyl-PEG conjugate did not destabilize the DNA complexes. Up to 10 mol% anionic PEG conjugate Lip-Asp₃-PEG-OMe relative to detergent could be incorporated to cationic Lip-C₆NH₃⁺/DNA NPs without disturbing DNA compaction. Similar results were obtained for Lip-Asp₅-PEG-OMe (data not shown).

DLS and zetametry experiments: To study the post-functionalization process, we created cationic polymeric DNA NPs with the Lip- $C_6NH_3^+$ detergent at $N/P=10$, and then added polymerizable/reducible polyanionic lipoyl-PEG conjugates Lip-Asp₃-PEG-OMe or Lip-Asp₅-PEG-OMe (5 or 10 mol%). The experiment was also performed with controls: Oct-Asp₃-PEG-OMe (anionic but not polymerizable), Lip-PEG-OMe (uncharged but polymerizable), and Oct-PEG-OMe (neutral with no polymerizable/reducible ability). The products were then analyzed by DLS and zetametry (Figure 6).

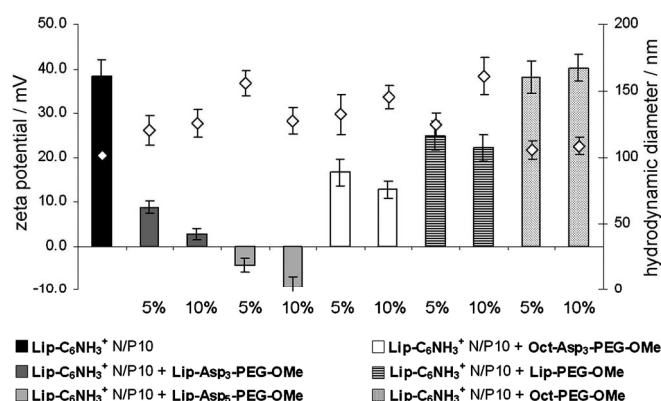


Figure 6. Zeta potential (bars) and hydrodynamic diameter (\diamond) of the Lip- $C_6NH_3^+$ /DNA complexes at $N/P=10$ and those coated/decorated with 5 or 10 mol% anionic PEG conjugate (relative to detergent).

The results strongly confirm our assumptions concerning the use of both a polyanionic moiety and a polymerizable residue to increase the level of functionalization. The zeta measurements clearly demonstrate that the electrostatic neutralization provided by anionic conjugates in conjunction with their polymerizable capabilities yielded better functionalization of the system. Indeed, the zeta potentials of Lip-Asp₃-PEG-OMe (8.8 and 2.7 mV for 5 and 10 mol%, respectively) and Lip-Asp₅-PEG-OMe (−4.3 and −9.2 mV for 5 and 10 mol%, respectively), which exhibit both abilities, gave better results than Oct-Asp₃-PEG-OMe (16.7 and 12.8 mV for 5 and 10 mol%, respectively), which has only the surface-neutralization ability, or Lip-PEG-OMe (24.9 and 22.1 mV for 5 and 10 mol%, respectively), which has only the polymerization ability. It is very interesting that the two abilities contributed separately to the functionalization process. Indeed, even though their actions were inferior to the two targeted compounds, both Oct-Asp₃-PEG-OMe and Lip-PEG-OMe conjugates were able to significantly decrease the charge surface of cationic DNA NPs. However, not surprisingly, electrostatic neutralization seemed a little more efficient than polymerization.

For the hydrophobic-anchor control, Oct-PEG-OMe, it is clear that the hydrophobic effect alone was not sufficient to promote full coverage of the surface. Highly cationic NPs were obtained, as attested by zeta potentials and DLS measurements. The zeta potentials (38 and 40.2 mV for 5 and 10 mol%, respectively) are equivalent to those for the starting (undecorated) cationic NPs, and the hydrodynamic diameters were also

unchanged (100–110 nm). This strongly suggests inefficient coverage and hence full recovery of cationic, nonfunctionalized DNA NPs. This study also shows that the use of a penta-anion instead of a tri-anion is more efficient, as the zeta potentials are even reversed: from slightly cationic (tri-aspartate derivative: 8.8 and 2.7 mV for 5 and 10 mol%, respectively), to slightly anionic (penta-aspartate: −4.3 and −9.2 mV for 5 and 10 mol%, respectively). Furthermore, it should be noted that whatever the formulation (except for the inefficient one, Oct-PEG-OMe), the amount of the conjugate had a small effect: the products obtained with 5 mol% were always slightly inferior to those with 10 mol%. Finally, functionalization was confirmed by the DLS results, which always showed an increase in the hydrodynamic diameter (D_h : ~20 to 50 nm, depending on conditions), except for Oct-PEG-OMe, where no functionalization occurred (data not shown).

TEM experiments: NPs were made from Lip- $C_6NH_3^+$ detergent at $N/P=10$ with or without 5 mol% polymerizable/reducible polyanionic lipoyl-PEG conjugate Lip-Asp₅-PEG-OMe (Figure 7).

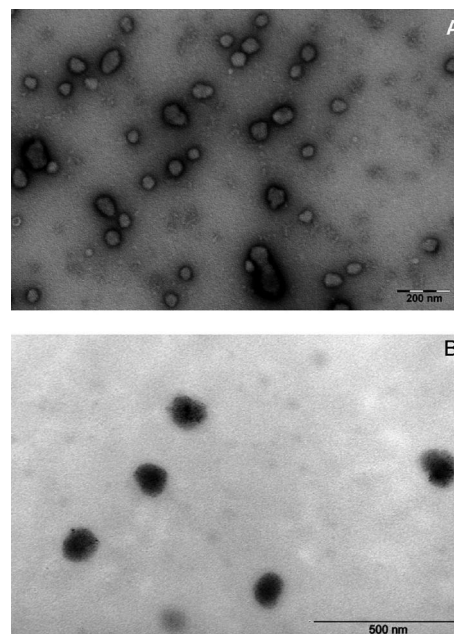


Figure 7. Transmission electron microscopy of DNA/Lip- $C_6NH_3^+$ NPs at $N/P=10$ A) without, or B) with 5 mol% Lip-Asp₅-PEG-OMe in HEPES 20 mM, pH 7.4.

The diameters of undecorated and PEGylated nanoparticles were 60 ± 14 and 128 ± 4 nm, respectively, consistent with the size prediction obtained from the DLS experiment. This illustrates the very high monodispersity that can be achieved by this strategy. The size differences between naked and functionalized NPs is a result of the PEG envelope, but also of an excess of water in PEGylated NPs, thus preventing excessive shrinkage during sample preparation (unlike naked NPs).

Salt-induced dissociation assay

The concentration of sodium in biological fluid is 136–144 mM. We therefore investigated the effect of salt concentration on

our formulations. To test stability, a salt-induced dissociation experiment was performed: measuring the intercalation of EB into formulations at different concentrations of NaCl (0–250 mM; Figure 8). Lip- $C_6NH_3^+$ formulations were as stable as

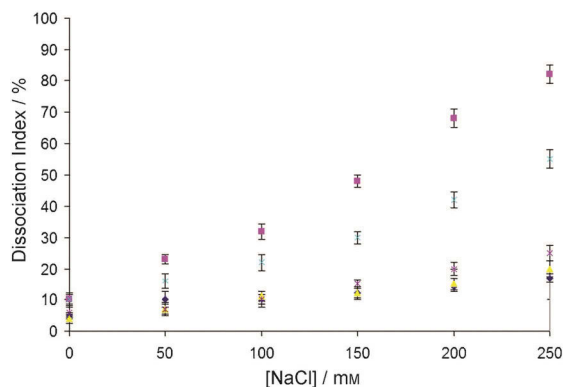


Figure 8. Salt-induced dissociation at 25 °C ($N/P = 10$) for DNA/Lip- $C_6NH_3^+$ nanoparticles freshly prepared in the absence (●) and in the presence (■) of 10 mM DTT, decorated with 10 mol% Lip- Asp_5 -PEG-OMe in the absence (▲) and in the presence (×) of 10 mM DTT. Experiments were carried out with a final DNA phosphate concentration of 60 μ M in 20 mM HEPES (pH 7.4) by adjusting the NaCl concentration (0–250 mM) and staining with EB (100 μ M in 20 mM HEPES, pH 7.4). Fluorescence emission at 600 nm was determined with $\lambda_{ex} = 520$ nm; control: PEI polyplexes (×).

PEI polyplexes, with dissociation indexes (DIs) of 18 and 25%, respectively, at 250 mM NaCl. Our decoration procedure did not have a detrimental impact on the stability of the corresponding formulation. Indeed, Lip- $C_6NH_3^+$ /DNA (decorated with polyanionic and polymerizable PEG conjugates) showed a DI in the same range (slightly higher) than those of undecorated particles. The results also clearly demonstrate that addition of DTT destabilizes formulations made up with the polymerizable/reducible residues, and hence the reduction increases DNA accessibility. Indeed, at all NaCl concentrations tested, the DIs were higher in the presence of DTT for all formulations containing the 1,2-dithiolane residue. Finally, the decorated formulations were also sensitive to reduction when subjected to DTT, even though this effect was less pronounced (DI always inferior when compared to the undecorated particles under the same conditions). The fact that decorated nanoparticles are less prone to dissociation compared to nonfunctionalized ones also indicates a “shielding” effect of the functionalized envelope.

Cell uptake and transfection efficiency

The polyanionic PEG conjugates were chosen for the proof of concept, in order to demonstrate their functionalization capability. However, the ultimate purpose is to use them in combination with specific ligands to promote specific targeting.

Cell viability and transfection efficiency of the DNA NPs formulated from Lip- $C_6NH_3^+$ at $N/P = 2, 5$, and 10 ± 5 mol% Lip- Asp_5 -PEG-OMe conjugate were evaluated *in vitro* by using a luciferase reporter gene (pDNA: pTG11236 (5739 bp)) on adherent COS-7 cells in 10% serum and at a low pDNA concen-

tration (0.5 μ g of pDNA per well; 15 μ M phosphate). Polyplexes prepared at $N/P = 10$ from JetPEI (a linear polyethylenimine transfection reagent; Polyplus Transfection, Illkirch, France), and naked pDNA were used as positive and negative controls, respectively (Figure 9).

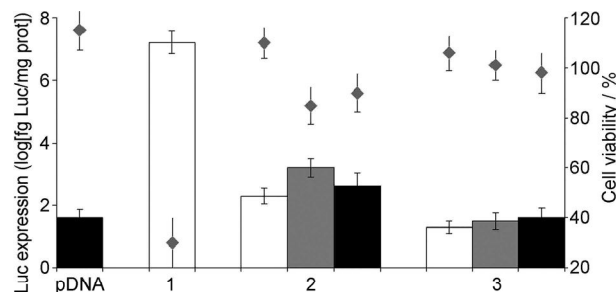


Figure 9. Transfection efficiency (bars) and cell viability (♦) in COS-7 cells for pDNA NPs formulated from JetPEI at $N/P = 10$ (1), Lip- $C_6NH_3^+$ (2) and Lip- $C_6NH_3^+$ with 5 mol% Lip- Asp_5 -PEG-OMe (3). $N/P = 2$ (□), 5 (■), or 10 (■); negative control: pDNA.

Very disappointedly, only a slight improvement in transfection efficiency (~40-fold) with respect to naked pDNA was detected for the NPs formulated with Lip- $C_6NH_3^+$ at $N/P = 5$. This is far less than for JetPEI polyplexes (enhancement of several orders of magnitude). Despite their low efficiency, our cationic DNA NPs are nevertheless less prone to toxicity compared to JetPEI polyplexes, as attested by cell viability (~90 and 30%, respectively). This result is particularly striking because Balakiriev et al.^[22] showed, with a very similar approach based on cationic lipoyl lipids, an effective transfection efficiency attributable to a proper redox-controlled gene-delivery ability provided by the 1,2-dithiolane system. They concluded that the several-fold enhancement in transfection efficiency (compared to a control) was attributable to glutathione (GSH-) and NAD(P)H-dependent reduction inside the cell, particularly under the higher redox conditions within the cell nucleus. For the decorated NPs, the level of luciferase expression was very low (same order as for naked DNA). Our decorated DNA NPs are stealth (PEGylated) NPs, with a slightly negative charge and no targeting abilities. Consequently, their transfection efficiencies were expected to be very poor compared to cationic NPs, which can exhibit nonspecific interactions with negatively charged heparan sulfate proteoglycans on the cell membrane.

To rule out any possible low cell penetration profile that could account for their poor efficiency despite their high cationic zeta potentials, the internalization of cationic lipoyl-based NPs was investigated by flow cytometry experiments. The decorated NPs were also assayed, despite their expected poor internalization profiles. EB-labeled DNA NPs were prepared with either Lip- $C_6NH_3^+$ (with or without 5 mol% Lip- Asp_5 -PEG-OMe conjugate) at $N/P = 10$ or JetPEI at $N/P = 10$ as control. High internalization efficiencies were observed for formulation made with Lip- $C_6NH_3^+$. Indeed, 83% of cells treated with EB-pDNA/Lip- $C_6NH_3^+$ NPs showed enhancement of red fluorescence due

to EB staining compared to control cells (untreated), whereas roughly 90 % was observed with EB-pDNA/JetPEI NPs. As expected, the level of internalization for the Lip-Asp₅-PEG-OMe-decorated NPs was lower than for purely cationic NPs (48 %; Figure 10). This result rules out an eventual problem of endocy-

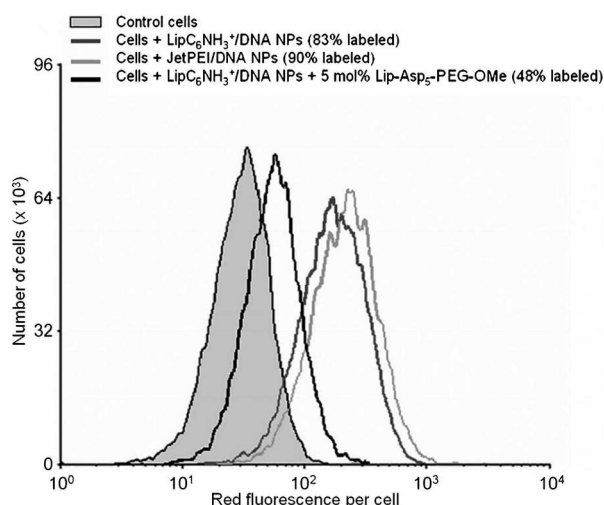


Figure 10. Uptake of EB-pDNA NPs formulated from Lip-C₆NH₃⁺ at *N/P* = 10 (—), Lip-C₆NH₃⁺ at *N/P* = 10 with 5 mol% Lip-Asp₅-PEG-OMe (—) and JetPEI at *N/P* = 10 (—) vs. control cells (—).

tosis. A transfection experiment with Lip-C₆NH₃⁺/pDNA NPs at *N/P* = 10 was also conducted in the presence of chloroquine, which is an endosomolytic agent (data not shown). No improvement in efficiency was observed, so endosomal escape is not a limiting step for these formulations. The quite low transfection efficiency could be related to particularly poor intracellular trafficking, thus preventing them from reaching the nucleus, where the reducing potential is higher than in the cytosol.^[33] Another possibility is too high stability of polymerization. The salt-induced dissociation assay experiments (above) showed that the DI rose to a substantial level only with high concentrations of salt (250 mM) and DTT (10 mM). This could be explained by higher degrees of polymerization, thus preventing fully effective release of DNA. The standard intracellular redox system provided by glutathione (GSSG/GSH) does not seem to play a major role here. The corresponding standard reduction potential of reduced glutathione (GSH) shows that GSH is not as strong a reducing agent as DTT at pH 7: $E_{0'}^{GSSG/GSH} = -263 \text{ mV}^{[34]}$ versus $E_{0'}^{DTT_{ox}/DTT_{red}} = -330 \text{ mV}^{[35]}$ and $E_{0'}^{LA/DHLA} = -320 \text{ mV}^{[36]}$. Therefore, GSH cannot reduce lipoyl to dehydrolipoyl residues. As mentioned previously,^[29] other redox systems operate within mammalian cells to produce 1,2-dithiolane redox turnover at the expense of NADH, such as 1) lipoamide dehydrogenase, cytosolic glutathione reductase (to a lesser extent), and thioredoxin reductase. Additionally, Balakirev et al.^[22] showed that reduction of their lipoate-based complexes was essentially attributable to thioredoxin reductase, whereas reduction by lipoamide dehydrogenase was inefficient. It is then striking that our compounds, based on a similar structure, did not undergo reduction by these redox

systems. The ultrastructure formed with DNA, combined with high degrees of polymerization, probably prevents the full reduction of all residues; this would lead to full destabilization of the DNA/Lip-C₆NH₃⁺ complex (*N/P* = 10). Finally, another explanation could be related to in situ biological oxidation of disulfide bonds to S-oxide and/or thiosulfinate,^[37] which might be more difficult to reduce.

Conclusions

We synthesized a cationic and polymerizable agent based on 1,2-dithiolane; it was able to condense pDNA into stable, small (~100 nm), monodisperse cationic NPs. We also efficiently prepared polyanionic and polymerizable PEG conjugates to post-functionalize the DNA NPs into more complex structures. Our results support ionic interactions as well as a polymerization process, occurring under very mild conditions. Post-functionalization of cationic DNA NPs can be tuned precisely, as charge neutralization correlates with the number of anionic counterions as well as the presence of the polymeric pattern. The non-specific interactions by residual cationic charges could then be decreased significantly. However, our system still shows important limitations, as positive DNA NPs based on lipoyl cations exhibited too much stability, and this resulted in poor transfection efficiency. This could be due to unfavorable cell trafficking and/or to too strong a “wrapping” effect by intermolecular polymerization of 1,2-dithiolane residues and/or to intramolecular oxidation into S-oxide. Each of these can hinder proper reduction by the intracellular redox systems required for destabilization and hence complete DNA release. Studies to determine the true cause are in progress. The use of a polycationic head based on linear or branched polyamines might improve the endosomolytic properties and favor release of DNA complexes into the cytoplasm. Furthermore, functionalization (at the free end of the PEG extremity) with a nuclear localization signal (NLS) or motifs hijacking the cytoskeleton machinery is relative easy and could promote transport toward and/or into the nucleus, where redox conditions are more favorable for the complete release of DNA. Despite some problems still hampering its use as synthetic viruses, this versatile strategy (straightforward chemistry) could nevertheless be adapted for the efficient functionalization of other nano-objects, such as (in)organic nanoprobe and nanotools, and allow their use in wider fields.

Experimental Section

Materials and methods: Reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification, with the exception of dichloromethane, which was distilled under an argon stream over CaH₂. Acetic acid, acetic anhydride, *N*-[(*tert*-butoxy)carbonyl]hexane-1,6-diamine, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), dithiothreitol (DTT), ethidium bromide (EB), Fmoc-L-aspartic acid 4-*tert*-butyl ester [Fmoc-Asp(OtBu)-OH], 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES), *N*-hydroxysuccinimide (HOSu), lipoic acid, octanoic acid, piperidine, sodium dodecyl sulfate (SDS), trifluoroacetic acid (TFA), trifluoroethanol

(TfE), and Sephadex gel filtration resin LH-20 were purchased from Sigma-Aldrich. Sephadex gel filtration resin LH-60 was purchased from (Amersham Pharmacia). *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) and 2-chlorotriethyl chloride resin were bought from IRIS Biotech (Marktredwitz, Germany), Tris acetate EDTA was from BioRad, JetPEI was from Polyplus, and α -(2-aminoethyl)- ω -methoxy-poly(oxy-1,2-ethanediyl) [NH₂-PEG-OMe] (*M_p* = 5079 Da, *n* ≈ 114) was from Rapp Polymer (Tübingen, Germany).

All reactions were performed under argon. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum sheets coated with Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck Millipore), with visualization by UV light (254 nm) and by charring with H₂SO₄ (10 %) or spraying with ninhydrin (0.1 %; Sigma-Aldrich) in EtOH or Dragendorff reagent (Sigma-Aldrich). Column chromatography was carried out on Silica Gel 60 (Merck Millipore, 230–400 mesh) and size exclusion chromatography was carried out on Sephadex LH-20 or LH-60 (Sigma-Aldrich). ¹H NMR spectra were recorded at 200 MHz on an AC 200 spectrometer (Bruker). Chemical shifts (δ , ppm) were measured relative to CDCl₃ (7.26 ppm), CD₃OD (3.31 ppm), or D₂O (4.79 ppm) for ¹H. ESI MS and ESI HRMS mass spectra were recorded, respectively, on esquire 3000 plus (Bruker Daltonics) and LTQ/FT-Orbitrap (Thermo-Fisher Scientific) spectrometers. UV-visible and fluorescence spectra were obtained on Cary 300 Scan (Varian) and LS 50B (Perkin-Elmer) spectrophotometers, respectively.

Preparation of cationic detergents

Synthesis of *N*-(6-aminohexyl)-1,2-dithiolane-3-pentanamide, Lip-C₆NH₃⁺ (chloride form): Synthesis of 1,2-dithiolane-3(R)-pentanoic acid, 2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl ester, **1a**: HOSu (1.5 equiv, 14 mmol, 1.40 g) and DCC (1.3 equiv, 12 mmol, 2.56 g) were successively added to lipoic acid (9.70 mmol, 2 g) in CH₂Cl₂ (10 mL) and stirred for 24 h at room temperature under argon and away from light. After filtration of dicyclohexylurea through celite, the filtrate was evaporated under vacuum. The obtained solid was triturated in cold isopropanol then filtered again. Compound **1a** was obtained as a yellow powder (2.29 g, 79%). *R_f* = 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.50–1.82 (m, 6H; (CH₂)₃CH₂CO₂), 1.84–2.00 (sext, 1H; SCH₂CH_{2a}), 2.39–2.55 (sext, 1H; SCH₂CH_{2b}), 2.63 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H; CH₂CO₂), 2.84 (s, 4H; cyclic CH₂), 3.05–3.25 (m, 2H; SCH₂), 3.58 ppm (quint, *J* = 6.7 Hz, 1H; SCH).

Synthesis of *N*-[6-(tert-butoxycarbonamido)hexyl]-1,2-dithiolane-3-pentanamide, **2a:** *N*-Hydroxysuccinimide-activated acid **1a** (0.66 mmol, 200 mg) was added to a solution of CH₂Cl₂ (20 mL) containing *N*-Boc-1,6-diaminohexane (1.2 equiv, 0.79 mmol, 0.17 g) and DIPEA (1.5 equiv, 0.99 mmol, 0.17 mL). After being stirred for 24 h at room temperature, the reaction mixture was successively washed with KHSO₄ (0.1 N), saturated NaHCO₃, then water. After drying over MgSO₄, filtration, and concentration under vacuum, the residue was purified by chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 98:2) to afford **2a** as a yellow solid (230 mg, 87%). *R_f* = 0.57 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.20–1.80 (m, 23H; (CH₂)₄CH₂NHBoc, (CH₂)₃CH₂CONH, 3CH₃), 1.81–2.00 (sext, 1H; SCH₂CH_{2a}), 2.2 (t, 2H; CH₂CONH), 2.36–2.57 (sext, 1H; SCH₂CH_{2b}), 3.05–3.3 (m, 6H; CH₂NHBoc, CONHCH₂, SCH₂), 3.45–3.65 (quint, 1H; SCH), 4.40–4.70 (brs, 1H; NHBoc), 5.50–5.80 ppm (brs, 1H; NHCO).

Synthesis of *N*-(6-aminohexyl)-1,2-dithiolane-3-pentanamide, Lip-C₆NH₃⁺ (chloride form): Compound **2a** (0.57 mmol, 231 mg) was added to a solution prepared by addition of acetyl chloride (15 equiv, 8.57 mmol, 0.61 mL) to anhydrous methanol (30 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h then concentrated. The residue was evaporated under vacuum with methanol (6×) and chloroform (3×). Lip-C₆NH₃⁺ (chloride

form) was obtained as an oily fairly yellow compound (0.18 g, 93%). *R_f* = 0.3 (8:2 CH₂Cl₂/MeOH); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.25–1.75 (m, 14H; (CH₂)₄CH₂NHBoc, (CH₂)₃CH₂CONH), 1.85–2.00 (sext, 1H; SCH₂CH_{2a}), 2.2 (t, 2H; CH₂CONH), 2.38–2.57 (sext, 1H; SCH₂CH_{2b}), 2.90–3.28 (m, 6H; CH₂NH₃⁺, CONHCH₂, SCH₂), 3.58–3.77 (m, 1H; SCH), 5.50–5.80 ppm (brs, 1H; NHCO); ¹³C NMR (MeOD): δ = 26.87, 27.09, 27.43, 28.55, 29.89, 30.18, 35.75, 36.88, 36.93, 39.46, 40.37, 40.95, 41.43, 57.65, 172.89 ppm; ESI-MS (positive mode): calcd for C₁₄H₂₈N₂O₅: 304.16 [M+H]⁺; found: 305.1.

Synthesis of *N*-(6-aminohexyl)octanamide, Oct-C₆NH₃⁺ (TFA form): Synthesis of octanoic acid, 2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl ester, **1b**: HOSu (1.5 equiv, 2.07 mmol, 238 mg) and DCC (1.3 equiv, 1.80 mmol, 370 mg) were successively added to octanoic acid (1.38 mmol, 220 μ L) in CH₂Cl₂ (5 mL) and stirred for 6 h at room temperature under argon atmosphere. After filtration of dicyclohexylurea through celite, the filtrate was evaporated under vacuum to afford **1b** as a white powder (340 mg, 98%). *R_f* = 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 0.82 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H; CH₃), 1.07–1.45 (m, 8H; CH₃(CH₂)₄), 1.68 (quint, 2H; CH₂CH₂CO₂), 2.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H; CH₂CO₂), 2.78 ppm (brs, 4H; cyclic CH₂).

Synthesis of *N*1-(octanoyl)-*N*5-[(tert-butoxy)carbonyl]-1,6-hexanediamine, **2b:** *N*-Hydroxysuccinimide-activated acid **1b** (1.57 mmol, 379 mg) was added to a solution of CH₂Cl₂ (40 mL) containing *N*-[(tert-butoxy)carbonyl]-1,6-hexanediamine (Sigma; 1.1 equiv, 1.73 mmol, 373 mg) and DIPEA (2.2 equiv, 3.46 mmol, 603 μ L). After stirring for 6 h at room temperature and concentration under vacuum, the residue was purified by chromatography over silica gel (CH₂Cl₂) to afford **2b** (618 mg, 87%). *R_f* = 0.73 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 0.87 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H; CH₃CH₂), 1.19–1.38 (m, 12H; CH₃(CH₂)₄, (CH₂)₂(CH₂)₂NHBoc), 1.43 (m, 13H; CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NHBoc, 3CH₃), 1.55–1.76 (m, 2H; CH₂CH₂CONH), 2.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H; CH₂CONH), 3.10 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H; CH₂NHBoc), 3.23 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H; CH₂CONHCH₂), 4.54 (brs, 1H; NHBoc), 5.60 ppm (brs, 1H; CH₂CONH).

Synthesis of *N*-(6-aminohexyl)octanamide, Oct-C₆NH₃⁺ (TFA form): Compound **2b** (0.29 mmol, 100 mg) in TFA/CH₂Cl₂ (1:1) was stirred for 3 h until disappearance (TLC monitoring). After concentration, the residue was evaporated several times under vacuum with cyclohexane and CH₂Cl₂. The compound was then precipitated in ether and filtered giving Oct-C₆NH₃⁺ (TFA form) as a white solid (103 mg, 99%). *R_f* = 0.33 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (CD₃OD): δ = 0.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H; CH₃CH₂), 1.23–1.45 (m, 12H; CH₃(CH₂)₄, (CH₂)₂(CH₂)₂NH₂), 1.45–1.71 (m, 6H; CH₂CH₂CONH, CH₂(CH₂)₂CH₂CH₂NH₂), 2.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H; CH₂CONH), 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H; CH₂NH₂), 3.16 ppm (t, *J* = 6.8 Hz, 2H; CONHCH₂); ¹³C NMR (MeOD): δ = 14.41, 23.05, 26.96, 27.11, 27.30, 28.44, 30.11, 30.18, 30.24, 32.88, 37.15, 40.00, 40.63, 176.36 ppm; ESI-MS (positive mode): calcd for C₁₄H₃₀N₂O: 242.24; found: 243.1 [M+H]⁺ and 265.3 [M+Na]⁺.

Preparation of neutral PEGylated conjugates

4.3.1. Synthesis of α -[2-[1,2-dithiolane-3-pentanoyl]amino]ethyl]- ω -methoxy-poly(oxy-1,2-ethanediyl), Lip-Peg-OMe: α -(2-Aminoethyl)- ω -methoxy-poly(oxy-1,2-ethanediyl) (NH₂-PEG-OMe, mean *M_w* 5 kDa; 1 equiv, 0.03 mmol, 150 mg) in CH₂Cl₂ (2.5 mL) containing DIPEA (1.5 equiv, 0.05 mmol, 8 μ L) was added in five portions to *N*-hydroxysuccinimide-activated acid **1a** (1.5 equiv, 0.05 mmol, 15.2 mg) in CH₂Cl₂. When all the amino-polyethylene glycol was used (TLC monitoring), the reaction mixture was concentrated in a minimum volume of CH₂Cl₂. Then a large amount of diethyl ether was added thereby resulting in simultaneous precipitation of **1a** and Lip-PEG-OMe. The solid was filtered, washed with cold ether, and dried

under vacuum. The mixture was purified over size-exclusion column chromatography Sephadex LH-60 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 2:8) to give Lip-PEG-OMe as a white solid (143 mg, 90%). $R_f=0.40$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=1.50\text{--}1.82$ (m, 6H; $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CONH}$), 1.81–2.00 (sext, 1H; SCH_2CH_2), 2.2 (t, 2H; CH_2CONH), 2.36–2.57 (sext, 1H; SCH_2CH_2), 3.05–4.04 (m, 462H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, OCH_3 , SCH , SCH_2), 6.25 ppm (s, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta=25.77$, 29.32, 35.06, 36.69, 38.85, 39.54, 40.62, 56.82, 59.42, 70.34, 70.59, 70.94, 71.25, 72.31, 173.20 ppm.

Isolated Lip-PEG-OMe was analyzed by ESI HRMS: calcd for $\text{C}_{239}\text{H}_{477}\text{NO}_{116}$ (for $n=114$): 1343.5133; found 1343.5122 $[\text{M}+4\text{Na}]^{4+}$.

Synthesis of α -[2-[(octanoyl)amino]ethyl]- ω -methoxy-poly(oxy-1,2-ethanediyl), Oct-Peg-OMe: The process for the preparation of Lip-PEG-OMe was applied to $\text{NH}_2\text{-PEG-OMe}$ (1 equiv, 0.03 mmol, 150 mg), DIPEA (1.5 equiv, 0.05 mmol, 8 μL), and *N*-hydroxysuccinimide-activated acid **1b** (1.5 equiv, 0.05 mmol, 12 mg). After treatment, the residue was purified over size-exclusion column chromatography to give Oct-PEG-OMe as a white solid (168 mg, 92%). $R_f=0.43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=0.85$ (t, $J=6.7$ Hz, 3H; CH_3CH_2), 1.12–1.34 (m, 8H; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$), 1.46–1.65 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.15 (t, $J=7.5$ Hz, 2H; CH_2CO), 3.21–4.04 (m, 456H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, OCH_3), 6.23 ppm (s, 1H; NH); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta=13.95$, 22.47, 25.62, 28.91, 29.16, 31.59, 36.55, 38.99, 58.89, 69.87, 70.05, 70.42, 70.63, 71.47, 71.79, 173.19 ppm; ESI-HRMS: calcd for $\text{C}_{231}\text{H}_{463}\text{NO}_{112}$ (for $n=110$): 1682.3601; found 1682.3593 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$.

Preparation of polyanionic PEG conjugates

Solid-phase synthesis of $4(p_3)$ and $4(p_5)$: Step 1, preparation of **3**: Resin 2-chlorotriyl chloride (1 equiv, 0.72 mmol, 925 mg) was swelled for 90 min in DMF (6 mL) under argon. DMF was filtered off, and DMF (4 mL) containing Fmoc-Asp(OtBu)-OH (2 equiv, 1.44 mmol, 592 mg) and DIPEA (3 equiv, 2.16 mmol, 376 μL) was added to the resin and stirred for 1 h at room temperature. This coupling reaction was repeated twice, then the resin was washed three times with DMF and CH_2Cl_2 . After the resin had been capped with DMF/MeOH (65:10), it was successively washed three times with DMF and CH_2Cl_2 .

Step 2, preparation of $4(p_3)$ and $4(p_5)$: Deprotection of the amino group was effected by treating the resin with DMF/piperidine (4:1, $5\times 4\text{ mL}$). This step also served as determination of first step efficiency, by titrating the Fmoc-piperidine adduct at 290 nm.^[15] Then a second residue of Fmoc-Asp(OtBu)-OH (2 equiv, 1.44 mmol, 592 mg) with HOBt (3 equiv, 2.16 mmol, 291 mg) in DMF (6 mL) was reacted with DIC (2.4 equiv, 1.3 mmol, 270 μL) for 15 min; when the amino acid was activated, the solution was added to the resin and stirred for 1 h. This process was repeated twice. A Kaiser test was performed to ensure total elongation and prevent further deletion by-products. Unreacted amines were capped with acetic anhydride. This procedure (Fmoc deprotection of amino acid onto resin then condensation of activated aspartic amino acid) was repeated twice and four times for $4(p_3)$ and $4(p_5)$, respectively.

Synthesis of Lip-Asp₃-PEG-OMe: Synthesis of **5a(p₃)**: After Fmoc deprotection of the amino group as above, activated lipoic acid **1a** (2 equiv, 1.44 mmol, 436 mg), DIPEA (2 equiv, 1.44 mmol, 250 μL), and dimethylaminopyridine (0.1 equiv, 0.07 mmol, 8.78 mg) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added onto resin $4(p_3)$ and stirred for 2 h. The condensation cycle was repeated twice, then the resin was washed three times with DMF. A Kaiser test was performed to ensure total elongation and prevent further deletion by-products. Furthermore, possible unreacted amines were capped with acetic anhydride.

The peptide was cleaved from resin by reaction with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ /acetic acid (4:1:1, 4 mL) for 2 h at room temperature. The resin was filtered off and washed three times with CH_2Cl_2 , and the organic phase was concentrated at room temperature to give **5a(p₃)** as a yellow liquid (498 mg, 96%). $R_f=0.63$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=1.43$ (brs, 29H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ and 9 CH_3), 1.59–1.75 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.81–1.98 (sext, 1H; SCH_2CH_2), 2.25 (t, $J=7.3$ Hz, 2H; CH_2CONH), 2.37–2.53 (sext, 1H; SCH_2CH_2), 2.65–2.71 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 2.77–2.82 (m, 4H; 2 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 3.03–3.24 (m, 2H; SCH_2), 3.58 (quint, $J=6.7$ Hz, 1H; SCH), 4.71–4.80 (m, 3H; NHCHCO), 6.87 (d, $J=8.0$ Hz, 1H; CH_2CONH), 7.53 (d, $J=8.2$ Hz, 1H; NHCHCO), 7.58 ppm (d, $J=8.2$ Hz, 1H; NHCHCO); ESI-MS (positive mode): calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}_2$: 719.31; found: 720.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ and 742.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Synthesis of $6a(p_3)$: Acid **5a(p₃)** (1.5 equiv, 0.03 mmol, 21.6 mg) in CH_2Cl_2 (5 mL) was activated by a mixture of HOBt (2.5 equiv, 0.05 mmol, 5.9 mg) and DIC (2 equiv, 0.04 mmol, 6 μL) for 15 min. $\text{NH}_2\text{-PEG-OMe}$ (1 equiv, 0.02 mmol, 99.6 mg) and DIPEA (2 equiv, 0.04 mmol, 7 μL) in CH_2Cl_2 (2.5 mL) were added in five portions, and this solution was stirred until all the amino-polyethylene glycol was used (TLC monitoring). The mixture was concentrated in minimum volume of CH_2Cl_2 , and a large amount of diethyl ether was added to result in simultaneous precipitation of excess of **5a(p₃)** and **6a(p₃)**. The solid was filtered, washed with cold ether, and dried under vacuum. The mixture was purified over size-exclusion column chromatography Sephadex LH-60 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2:8) to give **6a(p₃)** as a white solid (88 mg, 77%). $R_f=0.52$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=1.41$ (brs, 29H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ and 9 CH_3), 1.56–1.75 (m, 5H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.82–1.92 (m, 1H; SCH_2CH_2), 2.22 (t, $J=7.7$ Hz, 2H; CH_2CONH), 2.39–2.48 (m, 1H; SCH_2CH_2), 2.55–2.90 (m, 6H; $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 3.04–3.19 (m, 2H; SCH_2), 3.35 (s, 3H; OCH_3), 3.23–3.98 (m, 456H; SCH and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.56–4.77 (m, 3H; NHCHCO), 6.78 (d, $J=7.8$ Hz, 1H; CH_2CONH), 6.94 (brt, 1H; CONHPEG), 7.41–7.52 ppm (m, 2H; NHCHCO).

Synthesis of Lip-Asp₃-PEG-OMe: Compound **6a(p₃)** (1 equiv, 0.02 mmol, 87.4 mg) was poured into TFA/ CH_2Cl_2 (1:1) and stirred until disappearance of the starting material. After evaporation of solvents and co-evaporation with cyclohexane, the compound was concentrated under vacuum to afford Lip-Asp₃-PEG-OMe as a white solid (77 mg, 70%). $R_f=0.05$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); ^1H NMR (D_2O): $\delta=1.21\text{--}1.57$ (m, 6H; $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CO}$), 1.78–1.93 (m, 1H; SCH_2CH_2), 2.07–2.23 (m, 2H; CH_2CONH), 2.25–2.42 (m, 1H; SCH_2CH_2), 2.63–2.83 (m, 6H; $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 2.98–3.09 (m, 2H; SCH_2), 3.09–3.98 (m, 456H; SCH and $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.21 (s, 3H; OCH_3), 4.47–4.62 ppm (m, 3H; NHCHCO); ^{13}C NMR (D_2O): $\delta=25.32$, 28.31, 34.21, 35.53, 35.74, 35.88, 38.57, 39.57, 40.70, 50.45, 50.51, 50.69, 56.93, 58.49, 69.12, 69.87, 70.02, 70.33, 70.66, 71.05, 71.43, 172.19, 172.33, 172.84, 172.93, 174.29, 174.31, 177.07 ppm; ESI-HRMS: calcd for $\text{C}_{239}\text{H}_{468}\text{N}_4\text{O}_{115}\text{S}_2$ (for $n=108$): 2680.4893; found: 2680.4989, $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$.

Synthesis of Lip-Asp₅-PEG-OMe: Synthesis of **5a(p₅)**: As for **5a(p₃)**, white solid acid **5a(p₅)** was obtained from resin 2-chlorotriyl chloride (1 equiv, 0.75 mmol, 1 g) in 92% yield (751 mg) by the procedure described above. $R_f=0.55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=1.42$ (brs, 47H; $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ and 9 CH_3), 1.58–1.78 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.82–2.00 (sext, 1H; SCH_2CH_2), 2.26 (t, $J=7.1$ Hz, 2H; CH_2CONH), 2.38–2.53 (sext, 1H; SCH_2CH_2), 2.68–2.86 (m, 10H; $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$), 3.04–3.21 (m, 2H; SCH_2), 3.50–3.69 (m, 1H; SCH), 4.56–4.70 (m, 3H; NHCHCO), 4.70–4.81 (m, 2H; NHCHCO), 6.97 (d, $J=7.6$ Hz, 1H; CH_2CONH), 7.42 (d, $J=6.8$ Hz, 1H; NHCHCO), 7.48 (d, $J=8.4$ Hz, 1H; NHCHCO), 7.61 ppm (d, $J=$

7.4 Hz, 2H; NHCHCO); ESI-MS (positive mode): calcd for $C_{48}H_{79}N_5O_{17}S_2$: 1061.49; found: 1084.80 $[M+Na]^+$.

Synthesis of 6a(p₃): As for the preparation of 6a(p₃), 5a(p₃) (1.5 equiv, 0.05 mmol, 47.8 mg), HOBt (2.5 equiv, 0.08 mmol, 10.1 mg), and DIC (2 equiv, 0.06 mmol, 9.38 μ L) were reacted with NH₂-PEG-OMe (1 equiv, 0.03 mmol, 150.6 mg) to give 6a(p₃) as a white solid (141 mg, 78%). R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.43 (br s, 4H; CH₂(CH₂)₂CO and 9 CH₃), 1.59–1.76 (m, 4H; CH₂CH₂CH₂CH₂CO), 1.80–1.94 (m, 1H; SCH₂CH_{2a}), 2.25 (t, J = 6.9 Hz, CH₂CONH), 2.36–2.51 (sext, 1H; SCH₂CH_{2b}), 2.67–2.92 (m, 10H; CH₂CO₂tBu), 3.06–3.20 (m, 2H; SCH₂), 3.20–4.01 (m, 456H; SCH and CH₂CH₂O), 3.37 (s, 3H; OCH₃), 4.52–4.67 (m, 3H; NHCHCO), 4.67–4.81 (m, 2H; NHCHCO), 6.90–7.10 (m, 2H; CH₂CONH and CONHCH₂), 7.37–7.51 (m, 2H; NHCHCO), 7.54–7.67 ppm (m, 2H; NHCHCO).

Synthesis of Lip-Asp₃-PEG-OMe: The same protocol as for the tripeptide Lip-Asp₃-PEG-OMe was applied. Acidic treatment of 6a(p₃) gave the desired PEGylated pentapeptide conjugate in 90% yield (121 mg). ¹H NMR (D₂O): δ = 1.01–1.62 (m, 6H; (CH₂)₃CH₂CO), 1.66–1.89 (m, 1H; SCH₂CH_{2a}), 2.09–2.23 (m, 2H; CH₂CONH), 2.24–2.45 (m, 1H; SCH₂CH_{2b}), 2.52–2.88 (m, 10H; CH₂CO₂H), 3.00–3.10 (m, 2H; SCH₂), 3.11–3.99 (m, 456H; SCH and CH₂CH₂O), 3.20 (s, 3H; OCH₃), 4.43–4.61 ppm (m, 5H; NHCHCO); ¹³C NMR (D₂O): δ = 25.28, 28.23, 34.12, 35.54, 36.10, 36.24, 36.39, 36.59, 38.49, 39.53, 40.67, 50.76, 50.86, 50.90, 50.99, 51.08, 58.49, 56.88, 58.45, 69.08, 69.84, 69.99, 70.31, 70.63, 71.03, 71.39, 172.55, 172.67, 172.81, 173.14, 175.06, 175.17, 175.24, 177.24 ppm; ESI-HRMS: calcd for C₂₅₁H₄₈₆N₆O₁₂₇S₂ (for n = 110): 2839.5332; found: 2839.5520, $[M-2H]^{2-}$.

Synthesis of Oct-Asp₃-PEG-OMe: The procedure was similar to that described for Lip-Asp₃-PEG-OMe. Starting from resin 2-chlorotriptyl chloride (1 equiv, 0.75 mmol, 1 g), tripeptide 5b(p₃) was obtained in 98% yield (496 mg) as a light-yellow solid. Then, 5b(p₃) (1.5 equiv, 0.05 mmol, 30 mg) was condensed with NH₂-PEG-OMe (1 equiv, 0.03 mmol, 150 mg) to give 6b(p₃) as a white solid in 89% yield (159 mg); the final deprotected conjugate was obtained as a white solid in 70% yield. Analysis of 5b(p₃): R_f = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 0.86 (t, J = 6.4 Hz, 3H; CH₃CH₂), 1.20–1.36 (m, 8H; CH₃(CH₂)₄), 1.43 (s, 27H; 9CH₃C), 1.52–1.71 (m, 2H; CH₂CH₂CO), 2.23 (t, J = 7.60 Hz, 2H; CH₂CONH), 2.67 (brt, 2H; CH₂CO₂tBu), 2.81 (brt, 4H; CH₂CO₂tBu), 4.68–4.83 (m, 3H; NHCHCO), 6.60 (d, J = 7.6 Hz, 1H; CH₂CONH), 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 1H; NHCHCO), 7.61 ppm (d, J = 7.8 Hz, 1H; NHCHCO); ESI-MS (positive mode): calcd for C₃₂H₅₅N₃O₁₁: 657.38; found: 658.1 $[M+H]^+$ and 680.0 $[M+Na]^+$. Analysis of 6b(p₃): R_f = 0.40 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (CDCl₃): δ = 0.85 (t, J = 6.4 Hz, 3H; CH₃CH₂), 1.18–1.35 (m, 8H; CH₃(CH₂)₄), 1.42 (s, 27H; 9 CH₃C), 1.52–1.69 (m, 2H; CH₂CH₂CO), 2.21 (t, J = 7.6 Hz, 2H; CH₂CONH), 2.56–2.91 (m, 6H; CH₂CO₂tBu), 3.22–3.99 (m, 456H; OCH₃ and CH₂CH₂O), 4.56–4.76 (brs, 3H; NHCHCO), 6.73 (d, J = 7.6 Hz, 1H; CH₂CONH), 6.95 (t, J = 5.2 Hz, 1H; CONHPEG), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H; NHCHCO), 7.49 ppm (d, J = 8.4 Hz, 1H; NHCHCO). Analysis of Oct-Asp₃-PEG-OMe: R_f = 0.36 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); ¹H NMR (D₂O): δ = 0.68 (t, J = 5.6 Hz, 3H; CH₃CH₂), 1.09 (m, 8H; CH₃(CH₂)₄), 1.30–1.51 (m, 2H; CH₂CH₂CO), 2.11 (t, 7.6 Hz, 2H; CH₂CONH), 2.54–2.86 (m, 6H; CH₂CO₂H), 3.20 (s, 3H; OCH₃), 3.12–3.99 (m, 456H; OCH₃ and CH₂CH₂O), 4.53 ppm (m, 3H; NHCHCO); ¹³C NMR (D₂O): δ = 13.81, 22.37, 25.61, 28.49, 28.51, 31.37, 35.45, 35.68, 35.77, 35.84, 39.53, 50.40, 50.47, 50.67, 58.44, 69.08, 69.83, 69.98, 70.25, 70.97, 71.38, 172.23, 172.35, 172.39, 172.90, 174.31, 174.35, 177.67 ppm; ESI-HRMS: calcd for C₂₄₇H₄₈₆N₄O₁₂₃ (for n = 112): 2737.5640 found: 2737.5940 $[M-2H]^{2-}$.

Preparation of nanocomplexes composed of lipoyl derivatives and plasmid pTG11236: Plasmid pTG11236 (pCMV-SV40-luciferase-SV40pA, 5739 bp)^[14] was used for the preparation of the pDNA complexes and for the transfection assay. The amounts of compounds used were calculated for the desired DNA concentration, the N/P ratio (N : number of amine equivalents of detergent; P : number of phosphate equivalents of DNA), the molar weight, and the number of protonable nitrogen atoms in the selected lipoyl derivative (or JetPEI as a control). Experiments were performed for N/P = 5 and 10. For the preparation of DNA complexes from lipoyl derivatives, pDNA was diluted in HEPES (20 mM, pH 7.4) to a final concentration of 303 μ M for gel experiments and 60 μ M for DLS/zetametry, and fluorescence- and cell-based assays; the desired amount of lipoyl derivative was added from 10 or 20 mM stock solutions (in EtOH). The suspension was gently stirred at RT for one hour and then heated at 50 °C overnight with a thermo-shaker to induce thermal polymerization. In the case of JetPEI polyplexes, pDNA was diluted in NaCl (150 mM) to a final phosphate concentration of 60 μ M, and the desired amount of JetPEI was then added from a 7.5 mM water solution. The preparation was vortexed for 2 h before use.

Surface functionalization with PEG conjugates: After overnight shaking at 50 °C, PEG conjugate (5 or 10 mol%, relative to detergent amount) was added to the pDNA-Lipoyl derivative NPs (N/P = 10). Each suspension was stirred at 50 °C for 2 h.

DNA retardation assay by agarose gel electrophoresis: Each cationic derivative/DNA formulation (20 μ L, 0.4 μ g of plasmid) was submitted to electrophoresis for about 30 min (150 V, 0.8% agarose gel, in TAE buffer) and stained with ethidium bromide (20 μ L; EB (10 mg mL⁻¹) in TAE). The DNA was visualized on an UV transilluminator. The plasmid integrity in each sample was confirmed by electrophoresis after decomplexation by SDS (8%, data not shown).

Fluorescence assays: Detergent complexes and JetPEI polyplexes were prepared as described above at N/P = 0.8–8 (final DNA concentration, 60 μ M phosphate). Freshly prepared formulations were then immediately placed in a 96-well plate at 25.0 \pm 0.5 °C and stained with EB (100 μ M in HEPES (20 mM, pH 7.4)). Relative fluorescence intensity (RFI, λ_{ex} = 520 nm, λ_{em} = 600 nm) was recorded in a Genios Pro platereader (Tecan, Männedorf, Switzerland). RFI was calculated from $RFI_{(x)} = [F_{(x)} - F_0] / [F_{DNA} - F_0] \times 100$, where $RFI_{(x)}$ is the relative fluorescence intensity of formulation x , $F_{(x)}$ is the intensity of formulation x in the presence of EB in HEPES (20 mM, pH 7.4), F_0 is the intensity of EB without DNA in HEPES (20 mM, pH 7.4), and F_{DNA} is the intensity of naked DNA in the presence of EB in HEPES (10 mM, pH 7.4).

Absorbance spectra: The UV absorbance (250–400 nm) of Lip-C₆NH₃⁺ (100 μ L, 6 mM) in HEPES (20 mM at pH 7.4) was recorded in a Cary 300 Scan UV/Vis spectrophotometer (Varian) at different time points over 24 h to monitor the λ_{max} of 333 nm, which is consistent with the 1,2-dithiolane structure.

Measurement of the size of the complexes by dynamic light scattering spectroscopy (DLS) and their zeta potential by mixed-mode measurement phase analysis light scattering (M3-PALS): The average sizes and zeta potentials of the DNA complexes were measured at 25 °C in a Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments): sampling time, automatic; three measurements per sample; viscosity, 1.054 cP; refractive index, 1.33; scattering angle, 173°; λ = 633 nm; dielectric constant 80; $F(Ka)$ = 1.5 (Smoluchowsky) for zeta potential. Data were analyzed with the multimodal number distribution software included in the instrument. The results are from

three independent experiments and are given as volume distribution of the major population by mean diameter with its standard deviation. Zeta potentials were measured with M3-PALS experiments that consist of both slow-field reversal and fast-field reversal measurements to improve accuracy and resolution. Before each series of experiments, the performance of the instruments was checked with either 90 nm monodisperse latex beads (Beckman Coulter) for DLS or with a DTS 50 standard solution (Malvern) for zeta potentials.

Transmission electron microscopy (TEM): The morphology and size distribution of the NPs made from Lip-C₆NH₃⁺ detergent at *N/P* = 10, decorated (or not) with 5 mol% polyanionic PEG conjugate Lip-Asp₅-PEG-OMe were characterized by TEM. Formvar-carbon coated grids previously made hydrophilic by glow discharge were placed on top of small drops of the samples. After 1–3 min of contact, grids were negatively stained with a few drops of uranyl acetate (1%). The grids were then dried and observed with a CM12 electron microscope (Philips) under standard conditions. All experiments were performed twice for each formulation.

Salt-induced dissociation assay: All experiments were done with *N/P* = 10 and with Lip-Asp₅-PEG-OMe (the PEG conjugate that gave the best functionalization capacity). PEI polyplexes were used as a control. Cationic DNA complexes were prepared as described above, by adding the polymerizable/reducible cationic detergent Lip-C₆NH₃⁺ to the plasmid and by heating the corresponding formulation overnight at 50 °C to promote polymerization. The formulation containing the Lip-Asp₅-PEG-OMe conjugate was made with 10 mol% conjugate in cationic detergent. Formulations containing a large excess of DTT were carried out as negative controls, and were prepared either with cationic DNA complexes alone or decorated with the Lip-Asp₅-PEG-OMe conjugate. Dissociation was induced by adjusting NaCl to the desired concentration (0–250 mM). Finally, all formulations were subjected to EB intercalation (100 μM in HEPES (20 mM, pH 7.4)) and transferred to a 96-well plate. The dilution procedure ensured a final DNA concentration of 60 μM in each well; all measurements were done at 25 °C within 2 h after preparation.

Cell-based assays

Cell culture: Transformed African green monkey kidney fibroblast cells (COS-7 line) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with penicillin (100 U mL⁻¹), streptomycin (100 μg mL⁻¹), and heat-inactivated fetal calf serum (10%, FCS; Invitrogen).

In vitro transfection: Twenty-four hours before transfection, cells (2 × 10⁴ cells per well) were grown in 96-well plates in DMEM containing FCS (10%), in a humidified atmosphere (37 °C) with CO₂ (5%). Lip-C₆NH₃⁺/DNA (= pTG11236) complexes (above) with/without Lip-Asp₅-PEG-OMe conjugate (5 mol%) and JetPEI polyplexes were diluted (DNA, 5 μg L⁻¹) in DMEM (100 μL) supplemented with FCS (10%). The culture medium was removed from the cells and replaced with the complexes (100 μL). After 4 and 24 h, DMEM (50 and 100 μL, respectively) supplemented with FCS (10%) was added. After 48 h, the transfection was stopped, the culture medium was discarded, and the cells washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, 100 μL; Invitrogen), and then lysed in lysis buffer (50 μL Promega). The lysate was kept at –32 °C before luciferase activity analysis. This measurement was performed in 96-well plates with a Genios Pro luminometer (Tecan) in dynamic mode, for 10 s with lysis mixture (20 μL) by using the "Luciferase Assay System" (Promega) and following the supplier specifications. Total protein concentration in each well was determined by a BCA

test (Pierce/Thermo Scientific). Luciferase activity was calculated as femtograms of luciferase per milligram of protein. Cell viability [%] of the complexes was calculated as total protein per well (transfected cells) divided by that measured for untreated cells, times 100.

Flow cytometry: Plasmid DNA was labeled with EB (1 EB per 150 bp, 38 molecules/plasmid) prior to condensation with Lip-C₆NH₃⁺ with/without Lip-Asp₅-PEG-OMe conjugate (5 mol%) or JetPEI, as described above. DNA complexes were diluted in DMEM (500 μL) supplemented with FCS (10%) in order to have 2.5 μg of DNA per well (DNA phosphate concentration, 15 mM). Twenty-four hours before experiments, COS-7 cells were seeded (1 × 10⁵ cells per well) in 24-well plates in DMEM containing FCS (10%), in a humidified atmosphere (37 °C) with CO₂ (5%). The culture medium was removed and replaced with the EB-labeled DNA complexes (500 μL). After 4 h of incubation at 37 °C, the culture medium was discarded, and cells were washed with PBS (500 μL). To minimize false positives due to non-internalized/adsorbed EB-labeled DNA NPs, cells were washed with dextran sulfate (500 μL, 1 mg mL⁻¹ in PBS) and then incubated with serum-free DMEM (500 μL) containing DNA from calf thymus (Sigma) (200 mg L⁻¹) for 15 min in a humidified atmosphere (37 °C) with CO₂ (5%). Cells were then rinse twice with cold PBS (500 μL), harvested by trypsinase (trypsin/EDTA, Invitrogen), resuspended in DMEM (500 mL) with FCS (10%), collected by centrifugation (148 g, 5 min), washed twice with cold PBS (500 μL), and resuspended in PBS containing FCS (1%). Flow cytometry was performed in a FACS Calibur (BD Biosciences) with an argon laser (excitation, 360 nm for EB). Sorting windows were used on forward and side scatter to eliminate debris. Granulation, size, and fluorescence intensity (emission, 590 nm) were recorded (300 cells per second). Data were analyzed with winMDI (version 2.8, <http://facs.scripps.edu/software.html>).

Acknowledgements

We thank the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for financial support, and MNERT (C.C.) for grants. We thank Sophie Pagnotta from the "Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), Université de Nice–Sophia Antipolis" for TEM imagery. We thank Agnès Loubat from the Plateforme de cytométrie de flux, Université de Nice–Sophia Antipolis for flow cytometry experiments

The authors confirm there are no known conflicts of interest associated with this publication, and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Keywords: DNA · functionalization · liponic acid derivatives · nanoparticles · polyanionic PEGylated conjugate · polymerizable detergents

- [1] E. Mastrobattista, M. A. E. M. van der Aa, W. F. Hennink, D. J. A. Crommelin, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 115–121.
- [2] S. Jin, K. Ye, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 32–41.
- [3] K. I. Douglas, *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24*, 871–883.
- [4] K. Kogure, H. Akita, Y. Yamada, H. Harashima, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 559–571.
- [5] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2562–2574.

- [6] T. Nakamura, H. Akita, Y. Yamada, H. Hatakeyama, H. Harashima, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1113–1121.
- [7] M. A. Mintzer, E. E. Simanek, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259–302.
- [8] T. Blessing, J.-S. Remy, J.-P. Behr, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8519–8520.
- [9] E. Dauty, J.-S. Remy, T. Blessing, J.-P. Behr, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9227–9234.
- [10] C. Chittimalla, L. Zammuto-Italiano, G. Zuber, J.-P. Behr, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11436–11441.
- [11] K. Fabio, C. Di Giorgio, P. Vierling, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2005**, *1724*, 203–214.
- [12] G. Zuber, L. Zammuto-Italiano, F. Dauty, J.-P. Behr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2666–2669; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2770–2773.
- [13] F. Dauty, J.-S. Remy, G. Zuber, J.-P. Behr, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 831–839.
- [14] L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, J. Greiner, P. Vierling, *New J. Chem.* **2008**, *32*, 2027–2042.
- [15] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161–214.
- [16] A. Sadownik, J. Stefely, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7789–7791.
- [17] J. Stefely, M. A. Markowitz, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7463–7469.
- [18] "An Overview of Lipoate Chemistry", G. P. Biewenga, G. R. M. M. Haenen, A. Bast in *Lipoic Acid in Health and Disease* (Eds.: J. Fuchs, L. Packer, G. Zimmer), Marcel Dekker, New York, **1997**, pp. 1–32.
- [19] R. C. Thomas, L. J. Reed, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 6148–6149.
- [20] K. Endo, T. Shiroy, N. Murata, G. Kojima, T. Yamanaka, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3143–3150.
- [21] K. Endo, T. Yamanaka, *Macromolecules* **2006**, *39*, 4038–4043.
- [22] M. Balakirev, G. Schoehn, J. Chroboczek, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 813–819.
- [23] Y. Hao, M. Zhang, J. He, P. Ni, *Langmuir* **2012**, *28*, 6448–6460.
- [24] H. Li, X. Sun, D. Zhao, Z. Zhang, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2974–2985.
- [25] M. Soliman, R. Nasanit, S. R. Abulateefeh, S. Allen, M. C. Davies, S. S. Briggs, L. W. Seymour, J. A. Preece, A. M. Grabowska, S. A. Watson, C. Alexander, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1–13.
- [26] J. J. Green, E. Chiu, F. S. Leshchiner, J. Shi, R. Langer, D. G. Anderson, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 874–879.
- [27] Y.-C. Chung, W.-Y. Hsieh, T.-H. Young, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4194–4203.
- [28] I. J. De Cock, S. De Koker, B. G. De Geest, J. Grooten, C. Vervaeke, J. P. Remon, G. B. Sukhorukov, M. N. Antipina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6954–6973; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7108–7127.
- [29] F. S. J. Arn r, J. Nordberg, A. Holmgren, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *225*, 268–274.
- [30] S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeyev, K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2401–2408.
- [31] P. R. Brown, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3131–3135.
- [32] R. Singh, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6304–6309.
- [33] G. Bellomo, M. Vairretti, L. Stivala, F. Mirabelli, P. Richelmi, S. Orrenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4412–4416.
- [34] K. K. Millis, K. H. Weaver, D. L. Rabenstein, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4144–4146.
- [35] R. P. Szajewski, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2011–2026.
- [36] S. Roy, L. Packer, *BioFactors* **1998**, *7*, 263–267.
- [37] C. V. Krishnan, M. Garnett, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6*, 3607–3630.

Received: November 13, 2014

Published online on February 16, 2015

L'un des challenges dans le domaine de la délivrance d'ADN consiste à élaborer des nanovecteurs pouvant être pris en charge par les moteurs du cytosquelette, et en particulier par la dynéine cytoplasmique (type I) permettant un transport actif jusqu'au noyau le long des microtubules (MTs). Les séquences protéiques hautement conservées connues pour interagir avec les chaînes légères LC8 de la dynéine sont appelées DLC8-AS (*Dynein Light Chain Association Sequence*). Notre équipe a montré lors de précédents travaux que la fonctionnalisation de fluosphères en polystyrène par des séquences DLC8-AS permettait une accumulation périnucléaire efficace à condition de saturer leur surface en ligands. Cependant, de tels taux de fonctionnalisation ne sont pas envisageables dans le cas de nanoparticules (NPs) d'ADN car ils affecteraient grandement leur stabilité colloïdale. Pour compenser ces faibles taux de fonctionnalisation, nous avons développé dans cette thèse, des complexes d'ADN fonctionnalisés avec des dimères (et non des monomères) de DLC8-AS, ces derniers ayant été montrés comme plus affins pour les chaînes LC8. Parmi les quatre différents systèmes développés, deux ont permis de mettre en avant un bénéfice lié à l'effet multivalent des DLC8-AS. Le premier système comprend un amphiphile cationique, perfluoroalkylé dimérisable basé sur un résidu cystéine, F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺, utilisé en conjonction avec son homologue dimérisable et pegylé contenant des ligands DLC8-AS, pour produire, grâce à un processus d'oligomérisation, une population de petites NPs d'ADN fonctionnalisées ($Dh \sim 60$ nm). Les expériences réalisées sur cellules HeLa ont montré que les complexes d'ADN fonctionnalisés avec les DLC8-AS (pour la plupart sous forme multimérique) avaient des efficacités de transfection améliorées (~250 fois) grâce à un mécanisme dépendant du système dynéine/MTs, seulement si les formulations dépassaient une concentration seuil en ligands. L'autre système consiste à fonctionnaliser la surface de polyplexes de PEI (branché ou linéaire) avec des amphiphiles perfluoroalkylés octaarginine mono-DLC8-AS ou bis-DLC8-AS. De façon remarquable, l'efficacité de transfection, sur cellules HeLa, des polyplexes portant les ligands bis-DLC8-AS uniquement, a été améliorée d'un facteur 50 par rapport au JetPEI standard. Ici encore, le mécanisme dépend du réseau de MTs. Ces résultats renforcent l'intérêt de l'utilisation de dimères de DLC8-AS dans la conception de nanovecteurs d'ADN pouvant être pris en charge par le système dynéine/MTs.

Mots clés : Cytosquelette – Moteurs moléculaires – Dynéine – Microtubules – DLC8-AS – Thérapie génique non virale – Fonctionnalisation

A challenge in DNA delivery consists in engineering nanocarriers transported by cytoskeletal motors, and more particularly by the intracytoplasmic dynein (type I) which promotes active transport towards the nucleus along the microtubules (MTs). Dynein Light Chain 8 Associated Sequences (DLC8-AS) are highly conserved peptides that target the LC8 dynein light chain. Our team showed in a previous work that efficient nuclear localization of polystyrene fluospheres required a saturated surface with DLC8-AS ligands. However, such high levels of functionalization are unsuitable for maintaining sufficient colloidal stability when applied to DNA nanoparticles (NPs). To compensate this lower surface functionalization, we developed in this thesis DNA complexes functionalized with dimers (instead of monomers) of DLC8-AS which were shown to boost affinity towards LC8. Among the four different systems we designed, two revealed the benefit from taking advantage from the multivalent effect of DLC8-AS. The first one relies on a cationic and dimerizable perfluoroalkylated cysteine based amphiphile, F_4C_{10} -Cyst-TEO-NH₃⁺, which was used in conjunction with a dimerizable pegylated homologue containing DLC8-AS, to produce, through a thiol-disulfide oligomerisation process, a population of functionalized small sized DNA NPs ($Dh \sim 60$ nm). Experiments carried out onto HeLa cells, showed that DNA complexes functionalized with DLC8-AS (mostly under multimeric forms) exhibited enhanced transfection properties (~250 times) through a dynein/MTs dependant mechanism only if used beyond a concentration threshold. The other consists in functionalizing the surface of PEI polyplexes (either branched or linear) with a perfluoroalkylated octaarginine amphiphile carrying a mono- or bis-DLC8-AS as functionalizing agents. Remarkably, the transfection efficiency in HeLa cells of polyplexes bearing the bis-DLC8-AS ligands only, was increased by a 50 times factor compared to the JetPEI golden standard. Here too, the mechanism strongly depends on MTs. These data reinforce the use of dimeric DLC8-AS as a valuable approach for the design of motor driven DNA nanovectors.

Keywords: Cytoskeleton – Molecular motors – Dynein – Microtubules – DLC8-AS – Non viral Gene Delivery – Functionalization